



Hugo Manuel Bernardo Rocha

Licenciado em Medicina Veterinária

**Epidemiovigilância das infeções por *Leishmania* spp.
no efetivo cinotécnico da Guarda Nacional Republicana e
em mesocarnívoros silvestres**

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do Grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Doutora Mónica Cunha - INIAV
Coorientador: Dr. Jacinto Gomes - INIAV

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Margarida Casal Ribeiro Castro Caldas Braga
Arguente: Prof. Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca de Sampaio
Vogal: Doutora Mónica Sofia Vieira Cunha



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Agosto 2013



Hugo Manuel Bernardo Rocha

Licenciado em Medicina Veterinária

Epidemiovigilância das infeções por *Leishmania* spp. no efetivo cinotécnico da Guarda Nacional Republicana e em mesocarnívoros silvestres

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do Grau de Mestre em Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Doutora Mónica Cunha - INIAV
Coorientador: Dr. Jacinto Gomes - INIAV

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Margarida Casal Ribeiro Castro Caldas Braga
Arguente: Prof. Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca de Sampaio
Vogal: Doutora Mónica Sofia Vieira Cunha

Agosto de 2013

“Epidemiovigilância das infeções por *Leishmania* spp. no efetivo cinotécnico da Guarda Nacional Republicana e em mesocarnívoros silvestres” © Hugo Rocha, FCT/UNL, UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa têm o direito perpétuo, e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou em forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido, ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

A realização da presente dissertação marca o fim de mais uma etapa da minha vida profissional, por isso, gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram de forma importante e decisiva para a sua concretização.

Agradeço ao laboratório do INIAV-UEISPSA e toda a sua equipa pela formação científica que me proporcionou, e em especial, à Doutora Mónica Cunha, minha orientadora, por me ter proporcionado todas as condições necessárias para a realização do presente trabalho, pela sua disponibilidade e enorme paciência, e pela compreensão e apoio que me deu na superação das minhas limitações pessoais e profissionais. Agradeço-lhe as críticas construtivas e os conselhos recebidos, estou certo que foram fundamentais para o progresso deste trabalho e para a minha formação científica.

Agradeço ao Dr. Jacinto Gomes, meu coorientador no INIAV-UEISPSA, pela disponibilidade, paciência e amizade com que sempre me atendeu. A sua compreensão e orientação foi determinante na elaboração deste trabalho. Agradecimento especial à equipa da Parasitologia pela disponibilidade e ajuda dada.

Agradeço à Guarda Nacional Republicana (GNR) toda atenção e oportunidade que me tem dado na minha valorização profissional e realização pessoal, em especial à Divisão de Medicina Vetererinária à qual tenho a honra de pertencer, e que sempre acreditou e me apoiou em todos os momentos. É com muito orgulho que faço parte desta equipa, o meu mais sincero obrigado.

À equipa do IHMT, em especial à Professora Doutora Lenea Campino e à Doutora Sofia Cortes, pela disponibilidade e pelo carinho com que me atenderam. Agradeço a atenção e os conhecimentos que me transmitiram.

À Ana Cláudia e a Maria Neves o meu obrigado pela preciosa ajuda e amizade. Foi um prazer imenso trabalhar convosco.

Aos meus colegas de mestrado todo o apoio, carinho e ajuda que me deram durante estes três anos.

À minha família, namorada e amigos agradeço o apoio incondicional e toda a compreensão pelo tempo em que fui privado da vossa companhia.

A todos, o meu muito obrigado.

RESUMO

As leishmanioses são um grupo de doenças de transmissão essencialmente vetorial, causadas por protozoários intracelulares do género *Leishmania*, que afetam humanos, animais domésticos e silvestres. A leishmaniose canina tem elevada incidência e distribuição alargada em Portugal continental, onde a espécie *Leishmania infantum* é o agente etiológico. Neste trabalho, pretendeu-se contribuir para o estudo da epidemiologia da leishmaniose em Portugal, através da vigilância serológica e/ou molecular do efetivo cinotécnico da Guarda Nacional Republicana (N=190) e de uma população de carnívoros silvestres (N=136), constituída por sacarrabos (*Herpestes ichneumon*) (n=110), raposas (*Vulpes vulpes*) (n=18), fuinhas (*Martes foina*) (n=2), texugos (*Meles meles*) (n=3) e genetas (*Genetta genetta*) (n=3), provenientes de atropelamento, de ações cinegéticas ou de correção de densidade de predadores. O rastreio dos cães militares por imunofluorescência indireta evidenciou dez animais positivos, com uma seroprevalência de 5,26%, tendo-se identificado como fator de risco a origem geográfica. Os animais seropositivos foram analisados por métodos moleculares, visando a deteção de ADN cinetoplastideal (kADN) e da região espaçadora intergénica-1 (ITS-1) de *Leishmania* spp. em medula óssea por PCR convencional e/ou PCR em tempo real, tendo-se confirmado a presença em seis animais (60%). Entre a população silvestre, rastreada por amplificação de kADN em baço, identificou-se apenas um animal positivo (0,9%) da espécie sacarrabos. Os amplicões obtidos foram caracterizados por sequenciação e pela análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição com várias endonucleases, apresentando elevada homologia com isolados da espécie *L. infantum* (92-100%) depositados no GenBank e identificando-se dois padrões de restrição. A sequência de kADN detetada em sacarrabos evidenciou maior número de polimorfismos em relação à sequência de referência. Contrariamente a outros estudos, este trabalho não demonstra a exposição significativa de carnívoros silvestres a *Leishmania* spp., sendo necessários mais estudos para aprofundar o seu papel no ciclo epidemiológico da leishmaniose em Portugal, particularmente em zonas de sinantropia.

Palavras-chave: Leishmaniose, GNR, cão, carnívoros silvestres, imunofluorescência indireta, ADN cinetoplastideal, região espaçadora intergénica.

Abstract

Leishmaniasis is a group of vector-borne diseases caused by intracellular protozoa of the *Leishmania* genus that affects humans, domestic and wild animals. Canine *Leishmaniasis* has high incidence and wide distribution in mainland Portugal, where the species *L. infantum* is the etiological agent. This work aims to contribute to the study of *Leishmaniasis* epidemiology in Portugal, through the serological and/or molecular surveillance of Guarda Nacional Republicana's canine units (N=190) and a population of wild carnivores (N=136), consisting of mongooses (*Herpestes ichneumon*) (n=110), foxes (*Vulpes vulpes*) (n=18), stone martens (*Martes foina*) (n=2), badgers (*Meles meles*) (n=3) and genetids (*Genetta genetta*) (n=3) obtained from road-kills, cinegetic or predators density correction actions. Screening of the military dogs by indirect immunofluorescence showed ten positive animals, with a seroprevalence of 5.26%, with the geographical origin of the animals being identified as a risk factor. Seropositive animals were analyzed by molecular methods, aiming the detection of the kinetoplastid DNA (kDNA) and the intergenic transcribed spacer region-1 (ITS-1) of *Leishmania* spp. in bone marrow by conventional PCR and/or real-time PCR, yielding six positive animals (60%). Among the wild population, screened by amplification of kDNA in the spleen, only one positive animal (0.9%) of the species mongoose was identified. The amplicons obtained were characterized by sequencing and by RFLP analysis with several endonucleases, presenting high homology with isolates of the *L. infantum* species (92-100%) deposited in GenBank and giving rise to two restriction polymorphic patterns. In contrast to other reports, this work does not show significant exposure of wild carnivores to *Leishmania* spp., emphasizing the need of more studies to deepen the role of these species in the epidemiological cycle of *Leishmaniasis* in Portugal, particularly in areas of synanthropy.

Keywords: *Leishmaniasis*, GNR, dog, wild carnivores, indirect immunofluorescence, kinetoplastid ADN, intergenic transcribed spacer

Índice Geral

I	Introdução	1
1.	A leishmaniose	1
1.1.	Resenha histórica	1
1.2.	Etiologia e taxonomia	2
1.3.	Genoma do protozoário	3
1.4.	Ciclo de vida do protozoário	4
1.5.	Transmissão	5
1.6.	Hospedeiro vertebrado	6
1.7.	Hospedeiro invertebrado.....	7
1.8.	Patogenia e sintomatologia.....	8
1.9.	Epidemiologia	10
1.9.1.	No mundo	10
1.9.2.	Em Portugal.....	11
1.10.	Diagnóstico.....	12
1.10.1.	Parasitológico.....	12
1.10.2.	Serológico	13
1.10.3.	Molecular.....	13
1.11.	Caraterização da variabilidade genética	13
1.12.	Tratamento	14
1.13.	Profilaxia e controle	15
2.	O tema da tese	16
II	Material e métodos	17
1.	População amostrada.....	17
1.1.	População canina doméstica	17
1.1.	População silvestre	22
2.	Pesquisa de <i>Leishmania</i> spp. na população amostrada.....	26
2.1.	Imunofluorescência indireta (IFI)	26
2.2.	Citologia medular e exame clínico	27
2.3.	Métodos moleculares.....	27
2.3.1.	Extração de ADN total mediante utilização de sistemas comerciais.....	27
2.3.1.1.	Extração de ADN por recurso ao sistema <i>High Pure PCR Template Preparation</i> da Roche.....	27
2.3.1.2.	Extração de ADN por recurso ao sistema comercial <i>QIAamp® DNA Mini kit</i> da Quiagen..	28
2.3.2.	Amplificação de um fragmento do gene da β -actina por PCR	28
2.3.3.	Amplificação de um fragmento de ADN cinetoplastideal por PCR	29
2.3.4.	Amplificação da região espaçadora intergénica (ITS-1)	30

2.3.4.1.	Amplificação da região espaçadora intergênica (ITS-1) por PCR convencional ...	30
2.3.4.2.	Amplificação da região espaçadora intergênica (ITS-1) por PCR em tempo real.....	31
3.	Genotipagem dos isolados de <i>Leishmania</i> spp. por análise do polimorfismo dos fragmentos restrição dos produtos amplificados.....	31
4.	Análise das sequências nucleotídicas amplificadas	32
4.1.	Recuperação de ADN a partir de bandas do gel por recurso ao sistema comercial <i>Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification</i> da GE Healthcare.....	32
III	Resultados	35
1.	População amostrada.....	35
1.1.	Caraterização da população canina amostrada	35
1.2.	Caraterização da população silvestre amostrada.....	37
2.	Pesquisa de <i>Leishmania</i> spp. nas populações amostradas	40
2.1.	Rastreio serológico efetuado por imunofluorescência indireta à população canina doméstica.....	40
2.2.	Exame clínico e citologia medular	43
2.3.	Rastreio baseado em métodos moleculares	44
2.3.1.	Amplificação de um fragmento do gene da β -actina de mamíferos por PCR.....	44
2.3.2.	Amplificação de um fragmento de ADN cinetoplastideal de <i>Leishmania</i> spp. por PCR	45
2.3.3.	Amplificação da região espaçadora intergênica (ITS-1) por PCR.....	46
2.3.4.	Amplificação da região espaçadora intergênica (ITS-1) por PCR em tempo real.....	47
2.4.	Análise integrada dos resultados obtidos pelos diferentes métodos de diagnóstico... ..	49
3.	Genotipagem dos isolados de <i>Leishmania</i> spp. por métodos moleculares	51
3.1.	Genotipagem por análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição dos produtos amplificados (RFLP)	51
3.2.	Análise das sequências nucleotídicas dos produtos amplificados correspondentes a um fragmento de ADN cinetoplastideal	53
3.3.	Análise das sequências nucleotídicas dos produtos amplificados correspondentes a um fragmento da região espaçadora intergênica.....	55
IV	Discussão.....	57
V	Bibliografia.....	65

Índice de Figuras

Figura I.I - Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	5
Figura III.I - Distribuição dos cães em estudo por raça	35
Figura III.II - Distribuição dos cães em estudo por grupo etário	35
Figura III.III - Distribuição geográfica e número de cães do efetivo cinotécnico da GNR amostrados no presente trabalho.	36
Figura III.IV - Distribuição por espécie dos animais silvestres analisados	37
Figura III.V - Distribuição por faixa etária dos animais silvestres amostrados.....	38
Figura III.VI - Distribuição geográfica e número de animais silvestres amostrados no presente trabalho.	39
Figura III.VII - Seroprevalência de <i>Leishmania</i> spp. por grupo de faixa etária na população canina doméstica em estudo.	41
Figura III.VIII - Seroprevalência de <i>Leishmania</i> spp. por raça na população canina amostrada	41
Figura III.IX - Distribuição geográfica e número de cães seropositivos a <i>Leishmania</i> spp. O número de indivíduos amostrados por distrito de Portugal Continental encontra-se representado a cores, de acordo com a escala indicada.	42
Figura III.X – Presença de <i>Leishmania</i> spp. na forma amastigota em citologia de medula óssea	43
Figura III.XI – Exemplo de separação eletroforética em gel de agarose 1% (m/v) da reação de amplificação por PCR de um fragmento do gene da β -actina, com um tamanho de aproximadamente 289 pb.	45
Figura III.XII - Exemplo de separação eletroforética em gel de agarose 1% (m/v) da reação de amplificação por PCR de um fragmento de ADN cinetoplastideal, com um tamanho de aproximadamente 447 pb.....	45
Figura III.XIII - Separação eletroforética em gel de agarose 1% (m/v) da reação de amplificação por PCR de um fragmento de ADN cinetoplastideal, com um tamanho de aproximadamente 447 pb a partir do ADN de baço de mesocarnívoros silvestres.....	46
Figura III.XIV - Separação eletroforética em gel de agarose 1% (m/v) da reação de PCR para amplificação da região espaçadora intergénica (ITS-1), com um tamanho de aproximadamente 350 pb.	46
Figura III.XV - Valores de Ct obtidos na amplificação de ADN de <i>Leishmania</i> spp. por PCR em tempo real na população canina..	47
Figura III.XVI - Curvas representativas da amplificação da região espaçadora intergénica ITS-1 obtidas por PCR em tempo real em amostras selecionadas da população canina doméstica.....	48
Figura III.XVII - Curvas de temperatura de dissociação obtidas pela amplificação por PCR em tempo real da região espaçadora intergénica (ITS-1) de amostras selecionadas da população canina doméstica	49
Figura III.XVIII - Resultado dos exames complementares de diagnóstico na população canina doméstica que foi positiva ou duvidosa para <i>Leishmania</i> spp. à IFI.....	50
Figura III.XIX - Padrão de restrição de produtos de amplificação do ADN cinetoplastideal obtido com três endonucleases.	52

Figura III.XX - Alinhamento das sequências de consenso obtidas para os fragmentos de ADN cinetoplastideal amplificados a partir de amostras de medula dos cães examinados neste trabalho e comparação com a sequência de referência JQ609531.1	54
Figura III.XXI - Alinhamento das sequências de consenso obtidas para os fragmentos de ADN da região espaçadora intergênica amplificados a partir de amostras de medula dos cães examinados neste trabalho e comparação com a sequência de referência KC347301.1	55
Figura IV.I- Fluxograma de diagnóstico de leishmaniose num cão sintomático	63
Figura IV.II - Fluxograma de diagnóstico de leishmaniose num cão assintomático num país endêmico	64

Índice de Tabelas

Tabela I.1 - Principais espécies patogénicas do género <i>Leishmania</i> agrupadas em função da apresentação clínica da doença e área geográfica de distribuição	3
Tabela I.2 - Resumo das doenças, principais vetores, reservatórios e distribuição geográfica das principais espécies patogénicas de <i>Leishmania</i> spp.....	6
Tabela I.3 - Principais estudos que descrevem a presença de <i>Leishmania</i> spp. em espécies silvestres em Portugal	12
Tabela II.1 - Caracterização da população canina em estudo, por raça, sexo, data de nascimento e localização geográfica à data da amostragem.	17
Tabela II.2 - Caracterização da população silvestre em estudo por espécie, sexo, grupo etário e localização geográfica	23
Tabela II.3 - Caracterização das sequências iniciadoras utilizadas na amplificação do fragmento do gene da β -actina.....	28
Tabela II.4 - Caracterização das sequências oligonucleotídicas iniciadoras utilizadas na amplificação de um fragmento de ADN cinetoplastideal.	29
Tabela II.5 - Caracterização das sequências iniciadoras utilizadas na amplificação da região espaçadora intergénica (ITS)	31
Tabela III.1 - Distribuição geográfica dos cães amostrados por distrito	36
Tabela III.2 - Distribuição geográfica e número de cães do efetivo cinotécnico da GNR por Unidade Territorial de Estatística (NUTS).....	37
Tabela III.3 - Distribuição da população silvestre amostrada por distrito.	38
Tabela III.4 - Distribuição geográfica e proporção relativa dos animais silvestres amostrados nas diferentes Unidades Territoriais de Estatística.	38
Tabela III.5 - Distribuição geográfica e proporção relativa das raposas amostradas.	39
Tabela III.6 - Seroprevalência de <i>Leishmania</i> spp. por grupo etário, sexo e raça.....	40
Tabela III.7 – Seroprevalência de <i>Leishmania</i> spp. na população canina amostrada por distrito.	42
Tabela III.8 - Seroprevalência de <i>Leishmania</i> spp. na população canina amostrada por Unidades Territoriais de Estatística.	42
Tabela III.9 - Resumo dos resultados obtidos pelo exame clínico e citologia medular nos cães rastreados por IFI com resultado positivo e duvidoso ou negativo mas em tratamento para a leishmaniose.	43
Tabela III.10 - Amostras de mesocarnívoros testadas para a amplificação do gene codificante da β -actina por PCR.....	44
Tabela III.11 – Valores de Ct e da temperatura de dissociação das amostras positivas nas quais se obteve amplificação da região ITS-1 por PCR em tempo real.....	48
Tabela III.12 - Resumo dos resultados obtidos pelas diferentes metodologias aplicadas no diagnóstico de <i>Leishmania</i> spp. na população canina em estudo.....	51
Tabela III.13 - Padrões originados pelos fragmentos de restrição obtidos com cada endonuclease no amplificado de ADN cinetoplastideal	52

Tabela III.14 - Perfis de restrição obtidos com cada endonuclease no amplificado de ADN cinetoplastideal.....	52
Tabela III.15 - Genótipo e padrão de restrição originado pela ação da endonuclease <i>Hae III</i> sobre os produtos amplificados correspondentes à região espaçadora intergênica.	53
Tabela III.16 - Parâmetros obtidos do alinhamento das amostras de cães com o isolado de referência JQ609531.1.....	54
Tabela III.17 - Parâmetros obtidos do alinhamento das amostras de cães com o isolado de referência KC347301.1	56

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

µg Micrograma

µL Microlitro

µM Micromolar

x g Unidade de medida da força centrífuga

ADN Ácido desoxirribonucleico

ARN Ácido ribonucleico

BHI Infusão de Cérebro e Coração

CBA Centro de Biologia Ambiental

CFSPH Centro para a Segurança Alimentar e Saúde Pública

Ct Limiar de ciclo

dNTPS Mistura de 5'-trifosfato de desoxirribonucleótidos

EDTA Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA Ensaio imunoenzimático

FAST Teste rápido de aglutinação direta

FCT Faculdade de Ciências e Tecnologia

FCUL Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

FITC Isotiocinato de fluoresceína

g grama

GNR Guarda Nacional Republicana

HIV Vírus da Imunodeficiência Humana

ICNF Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas

IFI Imunofluorescência indireta

IGF-1 Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IHMT Instituto de Higiene e Medicina Tropical

IICAB Instituto para a Cooperação Internacional em Biologia Animal

IL Interleucina

INIAV Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

INRB Instituto Nacional dos Recursos Biológicos

ITS-1 Região espaçadora intergénica 1

kADN Ácido desoxirribonucleico cinetoplastideal

Kb Quilo pares de bases

LC Leishmaniose cutânea

LNIV Laboratório Nacional de Investigação Veterinária

LPG Lipofosfoglicano

m Massa

M Molar

mg Miligrama

MHC Complexo principal de histocompatibilidade

ml Mililitro
MLEE Electroforese enzimática de multilocus
MLST Tipagem de sequência multilocus
Mm Milímetro
mM Milimolar
NaH₂PO₄ Fosfato monossódico
NCBI National Center for Biotechnology Information
NMN Novy MacNeil Nicole
NUTS Unidades Unidades Territoriais para Fins Estatísticos
OMS Organização Mundial de Saúde
p/v peso/volume
Pb Pares de bases
PBS Tampão fosfato salino
PCR Reação da polimerase em cadeia
PGE2 Prostaglandina E2
pH Simétrico do logaritmo decimal da concentração hidrogeniônica
RAPD Amplificação de polimórficos de distribuição aleatória
RFLP Hidrólise do DNA amplificado por endonucleases de restrição
RFU Unidades de fluorescência relativa
RPM Rotações por minuto
rARN Ácido ribonucleico ribossomal
TBE Tris/Borato/EDTA
TE Tris/EDTA
Th1 Linfócito T auxiliar 1
Th2 Linfócito T auxiliar 2
TNF-α Fator de necrose tumoral
U Unidade
UNL Universidade Nova de Lisboa
WOAH Organização Mundial da Saúde Animal

I INTRODUÇÃO

1. A leishmaniose

A leishmaniose é uma importante doença humana do sistema mononuclear fagocitário, de transmissão essencialmente vetorial, e é causada por diversas espécies de *Leishmania*, na sua maioria zoonóticas.

A leishmaniose está presente praticamente em todos os continentes, sendo endémica nas regiões tropicais e subtropicais: América Latina, África, Índia, Médio Oriente e Bacia Mediterrânica. Estima-se que, aproximadamente, 350 milhões de pessoas vivam em áreas endémicas e que 14 milhões sejam diretamente afetadas pela doença, com uma taxa de mortalidade anual de 70.000 indivíduos (Ready, 2010). No Homem, a sua manifestação clínica varia, podendo apresentar uma forma cutânea, mucocutânea ou visceral.

Em Portugal, a leishmaniose visceral zoonótica é endémica e é causada pela espécie *Leishmania infantum*, sendo o seu principal reservatório o cão, que pode ser gravemente afetado pela doença (Campino e Maia, 2010). Nos últimos anos, outras espécies domésticas (Maia *et al.*, 2008) (Rolão *et al.*, 2005) e silvestres têm também sido apontadas como reservatórios ou possíveis reservatórios secundários (Sastre *et al.*, 2008), desconhecendo-se ainda o seu real contributo para a manutenção do ciclo zoonótico.

1.1. Resenha histórica

A leishmaniose é uma doença ancestral que não passou indiferente às várias civilizações, havendo registos datados de 650 anos AC de lesões muito sugestivas de leishmaniose cutânea (Bray, 1987).

No século X, vários médicos árabes, incluindo Avicenna (980-1037), descreveram detalhadamente o aparecimento de lesões de leishmaniose cutânea no norte do atual Afeganistão e depois, mais tarde, em vários locais do Médio Oriente, como Bagdad e Jericó (Bray, 1987).

Durante a colonização espanhola, a leishmaniose também não passou incógnita, havendo a menção em textos do século XV e XVI do risco de aparecimento de úlceras em trabalhadores sazonais que voltavam dos Andes. Mais tarde, com o aparecimento de casos clínicos em que havia desfiguração da boca e do nariz, a leishmaniose ficou conhecida como “lepra branca”. Concomitantemente, médicos indianos apelidaram uma doença visceral ancestral de Kala-azar, que significa “febre negra”, e que viria mais tarde a ser definida como leishmaniose visceral. Em 1756, Alexander Russell faz uma das primeiras e mais importantes descrições clínicas da leishmaniose cutânea, na altura conhecida por “Febre de Aleppo”, o que sugere que a doença era já bem conhecida em Aleppo e Bagdad, apesar de se desconhecer por completo a sua etiologia.

A primeira tentativa de identificação do agente etiológico foi feita em 1885 pelo Sargento-Mor Cunningham do serviço médico de Calcutá, a partir de uma biópsia de uma ferida cutânea. Na altura, Cunningham julgou ter visto esporos e postulou que a doença teria uma origem fúngica. Em 1898, um

militar russo, o Sargento D.F. Borovsky, identificou numa ferida cutânea um protozoário como agente etiológico, e descreveu a anatomia do organismo, identificando o cinetoplasto.

Só em 1900, quando William Leishman, um médico militar escocês, e Charles Donovan, professor de fisiologia na Universidade de Mandras, descobriram, independentemente, o parasita no baço de doentes com Kala-azar foi feita, então, a ligação entre o parasita e a leishmaniose visceral. Essa ligação foi depois explorada pelo Major Ross, que lhe atribuiu o nome de *Leishmania donovani*.

A descoberta do parasita causador da leishmaniose cutânea é atribuída ao americano James Homer Wright em 1903, que desconhecia os trabalhos de Cunningham e de Borovsky. No entanto, a ideia de que a leishmaniose cutânea seria transmitida ao Homem através de inoculação por ação de insectos do género *Phlebotomus* só surgiu em 1905 por Sargento e seus colegas, e três anos antes de Nicolle e Conte diagnosticarem leishmaniose visceral no cão (Bari, 2006).

Em 1973, a leishmaniose foi descrita por Rey como uma zoonose de animais silvestres, em especial roedores, cuja transmissão está dependente de insetos do género *Phlebotomus* no Velho Mundo (Europa, África e Ásia) e do género *Lutzomyia* no Novo Mundo (América). Atualmente são conhecidas diversas espécies de *Leishmania* patogénicas para o Homem, e estão identificadas várias espécies animais que atuam como reservatórios (Bari, 2006).

1.2. Etiologia e taxonomia

A leishmaniose visceral zoonótica é uma doença infecciosa e é causada por um protozoário, pertencente ao género *Leishmania*, da família Trypanosomatidae, da ordem Kinetoplastidae, do sub-reino Protozoa. A classificação taxonómica da *Leishmania* foi inicialmente determinada com base em critérios ecológicos e biológicos, tais como a distribuição geográfica, a manifestação clínica e o vetor. No entanto, com o desenvolvimento de métodos moleculares e bioquímicos, esses critérios tornaram-se inadequados, surgindo outros baseados na análise de ADN, de proteínas e de antígenos (Spickler *et al.*, 2010).

Os membros do género *Leishmania* são parasitas de mamíferos, conhecendo-se atualmente, cerca de 30 espécies, das quais aproximadamente 20 são patogénicas para o Homem (Bañuls *et al.*, 2007). O género *Leishmania* divide-se em dois sub-géneros, *Leishmania* e *Viannia*. Esta divisão foi feita com base no local de multiplicação do parasita no sistema digestivo do inseto vetor. As espécies patogénicas do género *Leishmania* predominantes no Velho Mundo são: *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, e o complexo *L. donovani* (*L. donovani* e *L. infantum*), enquanto que no Novo Mundo as espécies patogénicas mais prevalentes são: complexo *L. braziliensis* (*L. braziliensis*, *L. panamensis*/*L. guyanensis*, *L. colombiensis* e *L. peruviana*), complexo *L. mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*) e o complexo *L. donovani* (*L. chagasi*^{*}) (Tabela I.1) (Ameen, 2010).

* Alguns autores consideram que *L. chagasi* é uma subespécie da espécie *L. infantum*.

Tabela I.1 - Principais espécies patogênicas do gênero *Leishmania* agrupadas em função da apresentação clínica da doença e área geográfica de distribuição. [Adaptado de: (Ameen, 2010)].

Apresentação Clínica	Localização	Espécies
Leishmaniose cutânea	Velho Mundo	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. major</i> • <i>L. tropica</i> • <i>L. aethiopica</i>*
	Novo Mundo	Complexo <i>L. mexicana</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>L. mexicana</i> • <i>L. amazonensis</i> • <i>L. venezuelensis</i>
Leishmaniose cutânea/mucocutânea	Novo Mundo	Complexo <i>L. braziliensis</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>L. braziliensis</i> • <i>L. colombiense</i> • <i>L. guyanensis</i> • <i>L. panamensis</i> • <i>L. peruviana</i>
Leishmaniose visceral/cutânea	Velho Mundo	Complexo <i>L. donovani</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>L. donovani</i> • <i>L. infantum</i>
	Novo Mundo	Complexo <i>L. donovani</i> <ul style="list-style-type: none"> • <i>L. chagasi</i>

*Por vezes, forma mucocutânea

1.3. Genoma do protozoário

As espécies de *Leishmania* apresentam um genoma haplóide, de cerca de 32 milhões de pares de bases e que, no caso das espécies prevalentes no Velho Mundo, se encontra organizado em 36 cromossomas nucleares, enquanto que as espécies do Novo Mundo apresentam uma organização do ADN nuclear em 34 ou 35 cromossomas (Kazemi, 2011). Para além do genoma nuclear, as espécies de *Leishmania* apresentam ainda um genoma cinetoplastideial, que corresponde a cerca de 10 a 20% do ADN total (Kazemi, 2011). Atualmente, estão sequenciadas três estirpes de *Leishmania infantum* (incluindo a JPCM5), duas de *Leishmania major* (incluindo a Friedlin), duas de *L. mexicana* (incluindo a MHOM/GT/2001/U1103), uma de *L. donovani* e uma de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75M2904) (disponível no sitio do European Molecular Biology Laboratory: <http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/ERP000169>, acedido em 19 de fevereiro de 2013).

O genoma de *Leishmania* spp. apresenta algumas características atípicas dos eucariotas, nomeadamente a ausência de intrões, a presença de cromossomas pequenos com elevado número de genes confinados num pequeno espaço nuclear e, ainda, transcrição do tipo policistronica, característica de procariotas (Kazemi, 2011). Outra das diferenças reside no cinetoplasto, que é um organelo produtor de energia similar à mitocôndria dos eucariotas, mas que apresenta uma organização específica: possui cerca de 50 grandes moléculas circulares (maxicírculos) que codificam enzimas e coenzimas do ciclo de Krebs (Kazemi, 2011), interligadas a milhares de

pequenas moléculas circulares de ADN (minicírculos), com tamanhos compreendidos entre 0,5 e 2,5 kb, e que codificam ARN guia (ARNg) (Bañuls *et al.*, 2007; Lopes da Silva *et al.*, 2010; Cortes, 2008). Em relação ao ciclo sexual, e apesar deste se encontrar pouco estudado, quer na fase promastigota, quer na fase amastigota (Kazemi, 2011), há, no entanto, evidências de que *Leishmania* tem capacidade para ter um ciclo sexual consistente com um processo de meiose, como o descrito para os tripanossomas (Akopyants *et al.*, 2009). A existencia de híbridos do género *Leishmania* é uma característica de importância epidemiológica, que pode contribuir para o aparecimento de novos genótipos (Nolder *et al.*, 2007).

1.4. Ciclo de vida do protozoário

O ciclo de vida de *Leishmania* spp. é constituído por duas fases, uma fase extracelular num hospedeiro invertebrado e uma fase intracelular num hospedeiro vertebrado.

Os hospedeiros invertebrados variam de acordo com a espécie de *Leishmania*. Assim, no Novo Mundo, os hospedeiros invertebrados pertencem ao género *Lutzomyia* e, no Velho Mundo (Europa, África e Ásia) pertencem ao género *Phlebotomus*. No hospedeiro invertebrado, o protozoário assume uma forma alongada, flagelada e com mobilidade, designada de forma promastigota, e é nesta forma que *Leishmania* spp. é inoculada pelo vetor fêmea no hospedeiro vertebrado (Sharma e Singh, 2008). Após a inoculação, o parasita é fagocitado pelas células do sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro vertebrado e, ao fim de 12 a 24 h, torna-se ovóide (Sharma e Singh, 2008), com 2,5 a 5 µm de diâmetro (Bañuls *et al.*, 2007), e sem mobilidade ou flagelo, assumindo a forma intracelular que se designa de amastigota. Uma vez na forma amastigota, o parasita inicia a sua multiplicação no interior dos fagolisossomas da célula fagocitária, levando à sua destruição, por lise mecânica, e à infeção de outras células fagocitárias. Esta fase de multiplicação perpétua-se, podendo continuar durante meses, anos ou toda a vida do hospedeiro, sem que este mostre sinais clínicos. A manifestação clínica irá depender da suscetibilidade do hospedeiro e do seu estado imunitário. As células fagocitárias infetadas podem permanecer na pele dando origem a sinais cutâneos, cuja forma clínica é designada por cutânea ou mucocutânea, ou podem disseminar-se pelos outros órgãos, dando origem a sinais sistémicos, designando-se, nesse caso, por forma clínica visceral (Sharma e Singh, 2008).

O hospedeiro invertebrado infeta-se quando se alimenta do sangue do hospedeiro vertebrado infetado, cujos macrófagos contêm a forma amastigota de *Leishmania*. Algumas horas após a ingestão, as formas amastigotas começam-se a transformar e a multiplicar, por divisão binária, no tubo digestivo do vetor. Inicialmente, assumem uma forma alongada e apresentam um flagelo mais curto do que o corpo celular, denominada forma procíclica, e ao fim de cinco a nove dias (Afonso, 2011) assumem a forma promastigota metacíclica, com um flagelo duas a três vezes mais comprido do que o corpo celular (Sharma e Singh, 2008). As formas promastigotas metacíclicas acumulam-se na porção anterior do trato digestivo do vetor e são inoculadas no hospedeiro vertebrado, quando o vetor se alimenta, perpetuando assim o ciclo de vida (Cortes S. J., 2008).

1.5. Transmissão

A infecção por *Leishmania* spp. tem uma transmissão essencialmente vetorial sazonal em regiões temperadas, uma vez que as infecções são predominantes nos meses quentes quando o vetor está ativo. Nessas alturas, se a densidade de cães e de vetores for elevada, a espécie *L. infantum* pode disseminar-se muito rapidamente, estimando-se que possa infectar 63 a 80% da população canina. Contudo, apesar de alguns animais desenvolverem rapidamente sintomatologia clínica, estima-se que 90% (Spickler *et al.*, 2010) dos animais infectados permaneçam assintomáticos, podendo desenvolver sintomas apenas alguns meses ou anos após a infecção. Os gatos, os cavalos, os burros e outras espécies têm também casos esporádicos de leishmaniose, geralmente sob a forma cutânea (Spickler *et al.*, 2010). Alguns estudos recentes reportam percentagens elevadas de gatos seropositivos, o que sugere que estes possam estar subcl clinicamente infectados em algumas áreas geográficas (Maroli *et al.*, 2007).

Os principais vetores envolvidos na transmissão da leishmaniose são dos géneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, no entanto, outros artrópodes, incluindo as carraças (*Dermacentor variabilis* e *Rhipicephalus sanguineus*) e a pulga (*Ctenocephalides felis*), poderão também atuar como vetores mecânicos e, embora a sua importância em termos epidemiológicos seja considerada reduzida, poderão explicar os raros casos de transmissão em áreas onde os géneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* estão ausentes (Solano-Gallego *et al.*, 2012).

A principal via de transmissão da leishmaniose é vetorial, no entanto, registam-se ainda outras vias de transmissão, nomeadamente: por transfusão sanguínea (em pessoas e cães); por transmissão transplacentária (em cães, rato e humanos); e por transmissão venérea (em cães e humanos). Para além destas, estão identificadas outras potenciais vias de transmissão associadas à presença do parasita em fluidos de cães infectados: saliva (Lombardo *et al.*, 2012), urina (Riera e Valladares, 1996), sémen (Riera e Valladares, 1996), secreções conjuntivais (Leite *et al.*, 2010) e sangue (Manzillo *et al.*, 2005).

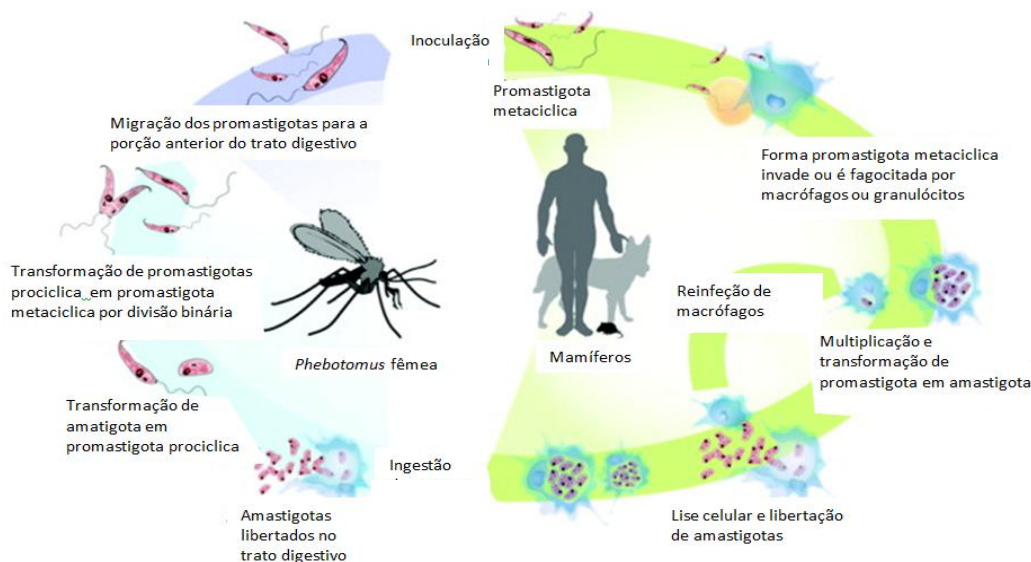


Figura I-I - Ciclo de vida de *Leishmania* spp. [Adaptado de: Harhay *et al.*, (2011)].

1.6. Hospedeiro vertebrado

Para além do Homem, estão já identificadas diversas espécies de mamíferos como hospedeiros vertebrados (Tabela 1.2), nomeadamente das famílias dos roedores, canídeos, edentados, marsupiais, ungulados, primatas não humanos e carnívoros. Estas espécies são consideradas potenciais reservatórios de doença (Bañuls *et al.*, 2007). Apesar do número de espécies animais que atua como reservatório para cada uma das espécies patogénicas de *Leishmania* ser limitado, estas podem também infetar e causar doença noutros animais. É o caso de *L. infantum* que tem o cão como principal reservatório e principal responsável pela manutenção do parasita no ciclo doméstico, mas que também causa doença ocasional numa ampla variedade de espécies animais, domésticas e silvestres (Spickler *et al.*, 2010).

Entre as domésticas, o cão é a espécie mais afetada, sendo, ocasionalmente descritos casos clínicos em gatos (Maroli *et al.*, 2007) e cavalos (Rolão *et al.*, 2005); nos animais de produção, está descrita a seropositividade de bovinos (*Bos indicus*) e cabras (*Capra hircus*) (Singh *et al.*, 2012). No que respeita aos animais silvestres, têm sido reportados, ocasionalmente, alguns casos clínicos em quase todos os continentes. Na Europa, está descrita a presença de *Leishmania* spp. no lobo cinzento (*Canis lupus*) (Luppi *et al.*, 2008), na geneta (*Genetta genetta*) (Millán *et al.*, 2011), na marta (*Martes martes*) (Millán *et al.*, 2011), no lince ibérico (*Lynx pardinus*) (Sobrino *et al.*, 2008), na lebre-ibérica (*Lepus granatensis*) (Molina *et al.*, 2012), no sacarrabos (*Herpestes ichneumon*) (Sobrino *et al.*, 2008), nos roedores (*Mus musculus* e *Rattus norvegicus*) (Helhazar *et al.* J. L., 2013) e na raposa vermelha (*Vulpes vulpes*) (Dipineto *et al.*, 2007). Na América foram reportados casos em cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*) (Luppi *et al.*, 2008), raposinha-do-campo (*Lycalopex vetulus*) (Luppi *et al.*, 2008), lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (Luppi *et al.*, 2008), gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) (Humberg *et al.*, 2012), gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) (Carreira *et al.*, 2012), morcego (*Carollia perspicillata*) (Lima *et al.*, 2008) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) (Luppi *et al.*, 2008). Na Austrália, existem relatos da associação de *Leishmania* spp. a lesões cutâneas em cangurus (Rose *et al.*, 2004), wallaroos (Dougall *et al.*, 2009) e wallabies (Dougall *et al.*, 2009). Na Ásia e África está descrita no chacal-comum (*Canis aureus*) (Bessad *et al.*, 2012), nos roedores (Pozio *et al.*, 1985) e nos sacarrabos (*Herpestes ichneumon*) (Elinaiem *et al.*, 2001). Alguns destes organismos podem atuar como reservatórios secundários (Maroli *et al.*, 2007).

Tabela 1.2 - Resumo das doenças, principais vetores, reservatórios e distribuição geográfica das principais espécies patogénicas de *Leishmania* spp. [Adaptado de: (Cortes 2008)].

Espécies no Velho Mundo	Principal doença causada	Vetor	Reservatório	Distribuição geográfica
<i>L. infantum</i>	LVZ	<i>P. ariasi</i> , <i>P. perniciosus</i> <i>P. chinensis</i>	Canídeos	Região Mediterrânea, Balcãs, Médio Oriente, Ásia Central, China,
<i>L. donovani</i>	LV	<i>P. argentipes</i> , <i>P. martini</i> <i>P. orientalis</i> <i>P. alexandri</i>	Homem; Roedores? e Canídeos	Índia, Paquistão, China, Quênia, Sudão, Etiópia
<i>L. major</i>	LCL	<i>P. papatasi</i> <i>P. duboscqi</i>	Roedores	Norte, Este e Oeste África Próximo e Médio Oriente, Ásia Central

<i>L. tropica</i>	LCL	<i>P. sergenti</i>	Homem e Canídeos	Médio Oriente, Paquistão, Índia, Região Mediterrânea
<i>L. aethiopica</i>	LCL	<i>P. longipes</i> <i>P. pedifer</i>	Hiraxes	Etiópia e Quênia
Espécies no Novo mundo				
<i>L. chagasi</i>	LVZ	<i>L. longipalpis</i> <i>L. evansi</i>	Canídeos	América Central e do Sul
<i>L. mexicana</i>	LCL	<i>L. olmeca olmeca</i>	Canídeos e Roedores	América Central e do Sul
<i>L. amazonensis</i>	LCL	<i>L. flaviscutellata</i>	Roedores e Marsupiais	América Central e do Sul
<i>L. venezuelensis</i>	LCL	<i>L. rangelliana</i>	Equinos e Felinos	Venezuela
<i>L. peruviana</i>	LCL	<i>L. peruensis</i> <i>L. verrucarum</i>	Canídeos e Roedores	Perú
<i>L. lainsoi</i>	LCL	<i>L. ubiquitalis</i>	Roedor	Brasil, Perú
<i>L. naiffi</i>	LCL	<i>L. ayrozai</i> <i>L. paraensis</i>	Desdentados	Brasil
<i>L. shawi</i>	LCL	<i>L. whitmani</i>	Primatas e Pergiças	Brasil
<i>L. guyanensis</i>	LCL	<i>L. umbratilis</i>	Canídeos, Roedores, Marsupiais, Primatas e Pergiças	América do Sul
<i>L. panamensis</i>	LCL	<i>L. panamensis</i> <i>L. trapidoi</i> <i>L. gomezi</i>	Marsupiais, Primatas e Pergiças	América Central e do Sul
<i>L. braziliensis</i>	LCL, LMC	<i>L. wellcomei</i>	Canídeos, Equinos e Roedores	América Central e do Sul

L. - *Leishmania*; *P.* - *Phlebotomus*; *L.* - *Lutzomyia*; LV - leishmaniose visceral; LVZ – leishmaniose visceral zoonótica; LCL – leishmaniose cutânea localizada; LMC – leishmaniose mucocutânea;

1.7. Hospedeiro invertebrado

Os hospedeiros invertebrados que comprovadamente transmitem *Leishmania* spp. pertencem à subfamília Phlebotominae da ordem Diptera. Dos seis gêneros existentes apenas dois têm importância médica, o gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e o gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo (Bañuls *et al.*, 2007). Recentemente foi também identificado como transmissor o gênero *Sergentomyia* (Campino *et al.*, 2013).

Estes insetos têm 2 a 5 mm de comprimento, cor castanha, antenas iguais em ambos os sexos, asas lanceoladas, pilosas, com seis nervuras longitudinais, sendo a segunda nervura bifurcada duas vezes, e apresentam dimorfismo sexual acentuado. As fêmeas são hematófagas e fitófagas e efetuam as posturas em solos húmidos, tais como tocas de roedores, grutas, galinheiros, coelheiras, lixeiras entre outros. Os machos são apenas fitófagos (Afonso, 2011). As larvas desenvolvem-se nos locais de postura e são saprófagas, sendo a duração média do ciclo de vida (ovo a adulto) de 45 a 60 dias, ocorrendo uma a duas gerações anuais em climas temperados (Afonso, 2011).

Estes pequenos insetos são mais ativos durante o crepúsculo e noite, quando há humidade e ausência de vento ou chuva (Spickler *et al.*, 2010), cessando a sua atividade abaixo dos 12° a 16° C (Afonso, 2011). Vivem em locais frescos e húmidos durante o dia e são atraídos pela luz, podendo entrar em edifícios durante a noite (Spickler *et al.*, 2010).

Das 500 espécies de *Phlebotomus* conhecidas, 31 foram identificadas como vetores de espécies patogénicas de *Leishmania* e 43 como vetores prováveis. A distribuição geográfica destas espécies é variável e algumas delas apenas suportam o crescimento de determinada espécie de *Leishmania*. É o

caso de *Phlebotomus papatasi* e *P. sergenti* que são vetores restritos de *L. major* e *L. tropica*, respetivamente (Bañuls *et al.*, 2007).

Em Portugal, as espécies vetores existentes e comprovadamente vetores de *L. infantum* são *Phlebotomus perniciosus* e *P. ariasi* (Campino e Maia, 2010). Para além da presença destas espécies, a vigilância epidemiológica que se faz dos vetores presentes em Portugal permitiu já verificar a existência das espécies *Phlebotomus papatasi* e *P. sergenti*, o que acarreta o risco de introdução de *L. major* e *L. tropica* (Afonso, 2011). Recentemente foi detetada a presença de *L. major* num espécime da espécie *Sergentomyia minuta*, estando ainda por clarificar a sua importância epidemiológica a nível nacional (Campino *et al.*, 2013).

1.8. Patogenia e sintomatologia

A resposta imunitária à *Leishmania* começa no local de inoculação, onde as células sentinela do sistema imunitário (macrófagos e células dendríticas) fagocitam as formas promastigotas (Freitas e Pinheiro, 2010). Alguns estudos referem que a entrada e sobrevivência de *Leishmania* spp. só é possível com a prévia infeção de neutrófilos que são recrutados como resposta primária à inoculação do vetor, sendo posteriormente fagocitados pelos macrófagos (Jochim e Teixeira, 2009), onde sobrevivem no seu interior. Uma vez no interior do macrófago, as formas promastigotas sofrem alterações bioquímicas e metabólicas significativas, transformando-se em amastigotas (Freitas e Pinheiro, 2010). As formas amastigotas conseguem subsistir aos efeitos oxidativos gerados pelos macrófagos, através da inibição da ativação da proteína C cinase. Para além deste o parasita possui outros fatores de virulência que favorecem a sua sobrevivência: as proteínas A2 nas formas amastigotas e as proteínas LMPK na forma promastigota, ambas de localização membranar (Freitas e Pinheiro, 2010) e que favorecem o seu reconhecimento pelas células fagocitárias; o lipofosfoglicano (LPG), que é um glicoconjugado expresso à superfície de *Leishmania* spp. e que confere resistência à lise pelas proteínas do complemento; a metaloprotease GP63 (Sacks e Sher, 2002), que interfere em vários processos de sinalização celular críticos, degradando cinases e fatores de transcrição e modulando mecanismos da expressão genética do hospedeiro (Isnard *et al.*, 2002); a cisteína protease (Mottram *et al.*, 1998), que modula a resposta imunitária do hospedeiro e a proteína CR3, que promove a opsonização, facilitando a fagocitose (Sacks e Sher, 2002) e, consequentemente, a sobrevivência do parasita.

A interação de *Leishmania* spp. com os recetores das células sentinela do sistema imunitário desencadeia a ativação da transcrição de genes que codificam citocinas, que determinam a suscetibilidade do hospedeiro. Deste modo, se a resposta imune for mediada por Th1, com produção de interferão- γ e TNF- α há maior probabilidade de o hospedeiro ficar assintomático, enquanto que se for mediada por Th2, com produção de IL-4 e IL10 é provável que fique sintomático (Sacks e Sher, 2002)

O principal mecanismo de defesa contra protozoários intracelulares é a imunidade do tipo celular, que resulta na ativação dos macrófagos por citocinas derivadas das células Th1 (Freitas e Pinheiro, 2010). Para tal, é necessário que haja a apresentação do antígeno no contexto do complexo principal

de histocompatibilidade (MHC) e a ativação de moléculas acessórias, como citocinas e fatores estimuladores. Os leucotrienos e o fator de ativação plaquetária estimulam o aumento de produção de óxido nítrico, participando assim diretamente na resistência à infecção. Enquanto que as prostaglandinas (PGE₂), o fator de crescimento (IGF-1), a adenosina e o fator indutor de hipóxia têm efeito contrário (Freitas e Pinheiro, 2010).

Dependendo da resposta imunitária do hospedeiro e da espécie de *Leishmania* em causa, a leishmaniose humana pode apresentar três formas clínicas: cutânea, visceral e muco-cutânea. No entanto, apesar de se verificar uma predisposição para que determinadas espécies de *Leishmania* apresentem a mesma forma clínica da doença, podem ocorrer exceções (Kimutai *et al.*, 2009). A leishmaniose cutânea (LC) é geralmente causada pelas espécies do subgênero *Viannia* e dos complexos *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* e *L. mexicana*. No entanto, qualquer espécie de *Leishmania* infetante para o homem pode originar lesões cutâneas. No Homem o período de incubação da leishmaniose cutânea varia de 1-2 semanas a vários meses, nas espécies do Novo Mundo, e até 3 anos nas espécies do Velho Mundo. No que respeita à leishmaniose visceral o período de incubação varia de 10 dias a vários anos, embora, na maioria dos casos, se torne aparente 2 a 6 meses após a infecção (Spickler *et al.*, 2010). A LC pode provocar dois tipos de lesões: uma lesão ulcerativa no local de inoculação do vetor invertebrado (forma localizada), e formação de múltiplos nódulos não ulcerativos (leishmaniose cutânea difusa) (Kimutai *et al.*, 2009). A LC é geralmente indolor, com excepção da orelha, e, a menos que ocorra infecção secundária, as úlceras tendem a manter-se confinadas à pele, não afectando o tecido subcutâneo. A maioria das lesões cura espontaneamente, podendo a cicatrização levar um ano ou mais. Algumas formas deixam uma cicatriz permanente (Reithinger *et al.*, 2007).

A leishmaniose mucocutânea é, frequentemente, causada por *L. braziliensis* e, por vezes, por *L. panamensis* e *L. guyanensis*. As lesões caracterizam-se por uma inflamação destrutiva da mucosa (Bañuls *et al.*, 2007), que tende a aparecer 1 a 5 anos após a cicatrização da leishmaniose cutânea causada por estas espécies. A inflamação pode proliferar e causar disfiguração severa da face ou obstruir a faringe ou a laringe. A forma mucocutânea de leishmaniose não cura espontaneamente (Spickler *et al.*, 2010).

A leishmaniose visceral é geralmente causada pelas espécies pertencentes ao complexo *L. donovani*. Os sintomas mais comuns são: febre, perda de peso, diminuição do apetite, anemia, distensão abdominal com esplenomegália e hepatomegália. Outros sintomas poderão ser: tosse, diarreia, linfadenopatia e insuficiência renal. Os casos mais moderados, com poucos sintomas, poderão resolver espontaneamente; os restantes casos necessitam de tratamento, podendo ser fatais quando há complicações e infecções secundárias. Casos fulminantes podem ocorrer em doentes coinfectados com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). Indivíduos assintomáticos ou que tenham sido tratados com sucesso podem recidivar em caso de imunodepressão. (Spickler *et al.*, 2010)

No cão os sinais clínicos podem ser muito vastos e variados e facilmente confundidos com outras doenças, podendo também ocorrer infecções assintomáticas. Nos casos sintomáticos o cão pode apresentar diversos sinais viscerais não específicos como: letargia, perda de peso, diminuição do apetite, anemia, esplenomegália, linfadenopatia local ou generalizada, febre intermitente, epistaxis,

hematúria, melena, insuficiência renal, lesões oculares, vômito, lesões de difícil cicatrização na pele ou mucosas, seborreia, diarreia, hepatite, lesões ósseas, meningite, alterações autoimunes, pericardite, tromboembolismo, vasculite, poliartrite, polimiosite e atrofia dos músculos temporais (Spickler *et al.*, 2010). Os sinais cutâneos como seborreia, dermatite exfoliativa não puriginosa à volta dos olhos e onicogribose são frequentes, podendo ainda ocorrer outros sinais cutâneos, tais como: erupções pustulares, paniculite, despigmentação, eritema multiforme, hiperqueratose nasal e digital, e casos semelhantes a dermatose autoimune (*Pemphigus foliaceus*) (Spickler *et al.*, 2010). As infecções secundárias causadas por bactérias, fungos ou parasitas são comuns em animais imunodeprimidos. Geralmente, a evolução da doença é progressiva, no entanto pode permanecer assintomática até ao aparecimento de insuficiência renal, o que piora significativamente o prognóstico.

Nos gatos, os casos clínicos são raros. A maioria dos casos reportados referem a presença de lesões cutâneas sem lesão visceral. As lesões cutâneas mais frequentes são nódulos localizados, pápulas e lesões ulcerativas que incidem, geralmente, no nariz, orelhas, pálpebras ou lábios (Spickler *et al.*, 2010).

Nos cavalos, mulas, e burros, podem-se desenvolver lesões cutâneas que consistem, na maioria dos casos, em pápulas, nódulos solitários ou múltiplos, e que estão frequentemente ulceradas, de localização predominante na cabeça (orelhas e pescoço), pernas e escroto. Nestas espécies animais, está descrita a disseminação cutânea da doença, mas não há registo de leishmaniose visceral (Spickler *et al.*, 2010).

1.9. Epidemiologia

1.9.1. No mundo

Estima-se que, aproximadamente, 350 milhões de pessoas vivam em áreas de transmissão ativa do parasita causador de leishmaniose, que 14 milhões sejam diretamente afetados pela doença e que ocorram 70.000 mortes por ano. Com a exceção da Antártida, *Leishmania* spp. está presente em todos os continentes, sendo endémica nas regiões tropicais e sub-tropicais (Spickler *et al.*, 2010). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), o impacto da leishmaniose na Saúde Pública está subestimado, porque a leishmaniose pode ser assintomática, a sintomatologia e diagnóstico podem ser confundidos com outras doenças e existem ainda países endémicos sem notificação obrigatória. Ainda de acordo com a OMS, estima-se que todos os anos surjam 2 milhões de novos casos de leishmaniose visceral nas zonas endémicas: América Latina, África, Índia, Médio Oriente e Bacia Mediterrânica (Ready, 2010). O aumento do número de casos de leishmaniose é atribuído conjuntamente a melhorias no diagnóstico e notificação, ao ineficiente controlo dos reservatórios e vetores, ao aumento das coinfeções com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), e ao aparecimento de resistência à terapêutica (Reithinger *et al.*, 2007). A maior complicação associada à leishmaniose reside, no entanto, nas coinfeções com HIV, particularmente alarmante em África (Etiópia e Sudão), onde se estima que 70% dos adultos com *Leishmania* spp. visceral estejam também infetados com HIV (Kimutai *et al.*, 2009).

A leishmaniose desempenha um papel significativo na propagação da pobreza, uma vez que, para além do custo do tratamento ser dispendioso e muitas vezes inacessível em países de fraco rendimento económico, a morbilidade associada à doença clínica tem efeitos na capacidade de trabalho e, por consequência, no rendimento disponível. Estima-se que a perda cumulativa anual associada à morbilidade e mortalidade causadas pela leishmaniose esteja compreendida entre 2 e 4 milhões de anos de vida (Reithinger *et al.*, 2007). Existem ainda evidências que sugerem que o ciclo de transmissão de *Leishmania* spp. se está a adaptar ao ambiente peridoméstico, incidindo em áreas até hoje não endémicas, como resultado da urbanização e desflorestação, sendo os animais domésticos os reservatórios (Reithinger *et al.*, 2007), e existindo uma correlação direta entre a prevalência de cães seropositivos e humanos infetados (Palatnik-de-Sousa, 2012). Dificuldades económicas, desastres naturais, conflitos armados e o turismo provocam migrações de populações e animais para áreas endémicas, promovendo a exposição à infeção e originando epidemias (Reithinger *et al.*, 2007). A alta prevalência de indivíduos portadores e assintomáticos no Sul da Europa sugere que este parasita é uma ameaça latente da saúde pública. (Ready, 2010).

1.9.2. Em Portugal

Em Portugal existem descrições de leishmaniose cutânea, visceral e zoonótica, provocada por *L. infantum* (Afonso, 2011).

Entre 2004 e 2008 foram declarados 79 novos casos clínicos de leishmaniose humana, (DGS, 2010) e, com o aumento das coinfeções por HIV, *Leishmania* spp., é, desde 1980, o terceiro parasita oportunista mais frequente, logo atrás do *Toxoplasma gondii* e de *Cryptosporidium* spp. (Campino e Maia, 2010).

Em relação à leishmaniose canina o número de cães infetados, sintomáticos e assintomáticos, é bastante maior, apresentando uma prevalência aproximada de 6,31% (Cortes *et al.*, 2012). De acordo com alguns estudos recentes, apesar da leishmaniose canina estar presente em praticamente todo o território nacional, há uma maior prevalência nos distritos do interior do que nos do litoral (Cortes *et al.*, 2012). Assim, os distritos de maior prevalência são Castelo Branco (17,40%), Portalegre (12,54%) e Beja (12,12%) (Cortes *et al.*, 2012). A leishmaniose canina é de notificação obrigatória desde 2002, tendo sido criado em 2008 o Observatório Nacional das Leishmanioses com o objetivo de implementar e manter uma rede de vigilância epidemiológica da leishmaniose (Campino e Maia, 2010). Para além destas, têm sido também efetuadas outras medidas, diretas ou indiretas, de controlo da doença na população canina, como o controlo de animais errantes, as ações de sensibilização junto da população, o tratamento ou abate de animais positivos, a identificação animal eletrónica e mais recentemente a vacinação.

Os zimodemes identificados na leishmaniose humana em Portugal são: MON-1, MON-24, MON-29 e o MON-80, sendo MON-1 o predominante (Campino *et al.*, 2006). Nas infeções caninas, o zimodeme MON-1 é predominante (Campino *et al.*, 2006) embora o MON-98 já tenha sido também identificado (Cardoso *et al.*, 2002)

No que respeita a outras espécies domésticas, a infeção por *Leishmania* spp. já foi encontrada em equinos (Rolão *et al.*, 2005), e em gatos (Maia *et al.*, 2008), podendo este último estar a atuar como reservatório secundário (Maroli *et al.*, 2007). Em relação aos animais silvestres (Tabela I.3), a infeção por *Leishmania* spp. está atualmente descrita no lobo (*Canis lupus*) (Sastre *et al.*, 2008), na raposa (*Vulpes vulpes*) (Abranches *et al.*, 1984) e em roedores (*Mus musculus* e *Rattus norvegicus*) (Helhazar *et al.* J. L., 2013), no entanto é possível que exista noutras espécies silvestres, uma vez que em Espanha já foi identificada também em sacarrabos (*Herpestes ichneumon*) (Sobrinho *et al.*, 2008), na geneta comum (*Genetta genetta*) (Sobrinho *et al.*, 2008), no lince ibérico (*Lynx pardinus*) (Sobrinho *et al.*, 2008) e na lebre ibérica (*Lepus granatensis*) (Ruiz-Fons, 2013).

Tabela I.3 - Principais estudos que descrevem a presença de *Leishmania* spp. em espécies silvestres em Portugal

Espécies	População (N)	Positivos (n)	Zona geográfica	Referência
<i>Canis lupus</i>	33	3	Centro de Portugal e Espanha	(Sastre <i>et al.</i> , 2008)
<i>Canis lupus</i>	40	17	Nordeste de Portugal	(Rosa <i>et al.</i> , 2013)
<i>Mus musculus</i>	27	9	Sintra e Sesimbra	(Helhazar <i>et al.</i> , 2013)
<i>Rattus norvegicus</i>	3	1	Sintra e Sesimbra	(Helhazar <i>et al.</i> , 2013)
<i>Vulpes vulpes</i>	43	3	Arrábida	(Abranches <i>et al.</i> , 1984)
<i>Vulpes vulpes</i>	50	17	Beira Interior e Alentejo	(Pereira da Fonseca <i>et al.</i> , 2002)
<i>Vulpes vulpes</i>	5	4	Arrábida	(Semião-Santos <i>et al.</i> , 1996)

1.10. Diagnóstico

1.10.1. Parasitológico

A leishmaniose cutânea pode ser diagnosticada por observação microscópica do parasita a partir de amostras obtidas por raspagem cutânea ou por punção aspirativa e coradas com Giemsa (WOAH, 2008).

Na leishmaniose visceral, o parasita pode ser observado através de citologia por aspiração da medula óssea, do baço ou do linfonodo (Kimutai *et al.*, 2009). A especificidade desta técnica é alta, enquanto que a sensibilidade varia de acordo com o tecido usado, sendo maior no baço (93-99%), por comparação com a medula óssea (53-86%) ou o linfonodo (53-65%) (Bhargava e Singh, 2012).

Em ambas as formas clínicas pode-se tentar a cultura *in vitro* do parasita por sementeira, em meio Novy-McNeil-Nicole (NMN), em meio de infusão cérebro-coração (BHI) e em outros, embora algumas espécies apresentem requisitos de crescimento específicos e outras sejam difíceis de isolar. A cultura *in vivo* em hamster (*Mesocricetus auratus*), embora muito demorada, também permite o diagnóstico, enquanto que a cultura *in vitro* demora entre 5 a 30 dias (WOAH, 2008).

1.10.2. Serológico

Os testes serológicos mais usados em humanos são: a imunofluorescência direta (IFA), a aglutinação direta, o ensaio imunoenzimático (ELISA), o teste rápido de aglutinação direta (FAST) e a imunocromatografia rápida. Outros métodos incluem a difusão em gel, a fixação do complemento, a hemaglutinação indireta e eletroforese contra corrente (WOAH, 2008).

Nos cães os testes serológicos mais utilizados são a imunofluorescência indireta (IFI), com uma sensibilidade de 96% e uma especificidade de 98%, e o ELISA, que apresenta uma sensibilidade de 86% a 99% e uma especificidade de 97% (WOAH, 2008). Para além destes, são ainda utilizados outros testes serológicos, como a aglutinação direta e a imunocromatografia (WOAH, 2008). Na maioria dos testes disponíveis os cães sintomáticos são seropositivos, no entanto, apenas uma percentagem dos assintomáticos, ou dos que apresentam apenas uma lesão cutânea isolada, têm anticorpos detetáveis (Spickler *et al.*, 2010), podendo ainda ocorrer reações cruzadas com outros parasitas (Alves *et al.*, 2012), em particular com *Trypanosoma cruzi*. (WOAH, 2008).

Os testes serológicos devem ser complementados com outras metodologias de diagnóstico, uma vez que por si só não diferenciam doença aguda, infeções assintomáticas, recidivas e casos curados (Ready, 2010).

1.10.3. Molecular

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) é particularmente sensível e pode ser usada para detetar ADN de *Leishmania* spp. no sangue, em biópsias de pele, gânglios linfáticos, medula óssea e amostras conjuntivais (Spickler *et al.*, 2010). Várias sequências oligonucleótídicas que visam a amplificação de fragmentos de diferentes alvos genéticos têm sido descritas para esse efeito (Bhargava e Singh, 2012).

Outra metodologia que tem mostrado resultados promissores no diagnóstico da leishmaniose visceral no sangue é o PCR-ELISA descrito por (Martin Sanchez *et al.*, 2001), embora este método tenha sido maioritariamente aplicado ao estudo das infeções de *Leishmania* spp. em doentes HIV-positivos, que apresentam níveis de parasitemia elevados (Bhargava e Singh, 2012).

Um método ainda mais sensível (90-100%) no diagnóstico molecular é o PCR em tempo real, que monitoriza em contínuo a amplificação do ADN. Este método permite ainda determinar a quantidade de ADN presente na amostra (Bhargava e Singh, 2012).

1.11. Caracterização da variabilidade genética

Têm sido usadas várias técnicas moleculares na caracterização das variantes genéticas das espécies do género *Leishmania*. As mais comuns são a análise do polimorfismo de fragmentos de ADN amplificados aleatoriamente (RAPD), a análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição (RFLP) de regiões espaçadoras intergénicas de ADN ribossomal e de ADN cinetoplastideal; a análise da sequenciação de regiões amplificadas, a análise por hibridação de sondas de ADN (Southern blotting) e a análise de regiões de ADN com marcadores microssatélites. Das técnicas referidas as que apresentam maior poder discriminatório são: a análise por microssatélites e a análise por RFLP do

ADN do cinetoplasto. Esta última tem sido usada com diferentes objetivos, nomeadamente na comparação de linhagens isoladas de diferentes hospedeiros; na diferenciação entre os ciclos de transmissão zoonótico e antroponótico; na identificação de novos genótipos em vetores e hospedeiros; na identificação de genótipos relacionados com a resistência a medicamentos; na diferenciação entre casos de recidivas e reinfeção, e na deteção de epidemias. A análise por RFLP dos minicírculos do kADN apresenta maior poder discriminatório quando aplicada ao estudo da genética de populações de linhagens muito próximas (Alonso, 2011).

A análise isoenzimática (MLEE) é considerada a técnica de referência para a identificação das espécies de *Leishmania* e para estudos de diversidade genética. A MLEE deteta diferentes alelos de genes essenciais (*housekeeping*) através da diferente mobilidade eletroforética das enzimas codificadas. A diferença na mobilidade geralmente reflete as diferenças na carga das proteínas e, indiretamente, a diferença nos nucleótidos que as codificam. Na análise por MLEE assume-se que os isolados que exibem a mesma mobilidade para uma determinada enzima contêm o mesmo alelo do gene em causa. O zimodeme agrupa os isolados que exibem alelos idênticos em todos os genes caracterizados, o que é inferido pela presença de perfis idênticos para todas as enzimas em estudo. Apesar de internacionalmente reconhecida, esta técnica tem inúmeras desvantagens: necessita de culturas viáveis de *Leishmania*, usa grandes quantidades de proteína, é morosa, fastidiosa e tem pouco poder discriminatório, uma vez que alterações nos nucleótidos que não causem alteração de aminoácido não são detetáveis (Bañuls *et al.*, 2007).

Uma técnica de genotipagem que permite ultrapassar alguns destes problemas é a técnica de *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) que tira vantagem da velocidade e simplicidade da amplificação e sequenciação automática do ADN. Embora tenha maior poder discriminatório que a MLEE, o seu uso no estudo da epidemiologia da leishmaniose ainda é reduzido (Bañuls *et al.*, 2007).

1.12. Tratamento

Os fármacos de eleição para o tratamento da leishmaniose humana visceral e cutânea são os antimoniais pentavalentes, nomeadamente o estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumina. Estes fármacos, desenvolvidos em 1945, permaneceram durante cinco décadas sem registo de resistências (Bhargava e Singh, 2012). No entanto, com o aparecimento de doentes refratários aos antimoniais pentavalentes, outras moléculas têm sido usadas no tratamento da leishmaniose, como a anfotericina B (anti-fúngico), a miltefosina (agente anti-tumoral), a paromomicina (antibiótico) e a sitamaquina (análogo antimalárico). Estes medicamentos não são específicos para a leishmaniose e apresentam melhores resultados em protocolos combinados (Bhargava e Singh, 2012).

No que respeita à leishmaniose canina os fármacos mais utilizados e, com efeito, anti-*Leishmania* comprovado são: o antimoniato de meglumina, o alopurinol e a miltefosina (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Para além dos referidos fármacos, alguns antibióticos, nomeadamente o metronidazol associado à espiramicina (Pennisi *et al.*, 2005) e a marbofloxacin (Farca *et al.*, 2012) parecem ter também alguma ação anti-*Leishmania*. Como adjuvantes dos tratamentos são também usados imunomoduladores, nomeadamente o levamisol (Crendo-Casanegra *et al.*, 1992), as citocinas

(Ciaramella e Corona, 2003) e a domperidona (Gómez-Ochoa *et al.*, 2009). Alguns estudos referem a possibilidade de se usar a vacinação com a Leishmune® (Borja-Cabrera *et al.*, 2012) e, possivelmente, a Canileish® (Moreno *et al.*, 2012) como imunoterapia. O tratamento da leishmaniose canina permite, na maioria dos casos, a recuperação clínica, mas não evita a ocorrência de recidivas (Baneth e Shawb, 2002).

1.13. Profilaxia e controle

O controle da leishmaniose passa pela adoção de um conjunto integrado de medidas profiláticas que atuem sobre o hospedeiro vertebrado, o vetor e o ambiente.

No que respeita ao principal reservatório, o cão, estão descritas várias medidas profiláticas que reduzem efetivamente o risco de infecção por *L. infantum* como a aplicação cutânea mensal de uma solução de permetrina a 65% por *spot-on* ou a colocação de uma coleira impregnada com deltametrina durante 5 meses (Ferroglia *et al.*, 2008). A associação de imidaclopride 10% (p/v) e permetrina 50% (p/v) em solução *spot-on* aplicada cada 3 semanas também se mostrou eficaz como repelente de *P. perniciosus* (Miró *et al.*, 2007). Outras medidas dificultam também a transmissão da doença, como o confinamento dos cães na altura de maior atividade do vetor, ao amanhecer e ao anoitecer (Solano-Gallego *et al.*, 2011), e a colocação de redes mosquiteiras nas casas e canis (Palatnik-de-Sousa, 2012). Alguns países, como o Brasil e a China, têm aplicado medidas sanitárias mais drásticas, como o abate de cães seropositivos (Palatnik-de-Sousa, 2012), no entanto esta medida é socialmente controversa e, do ponto de vista técnico, é considerada por muitos autores como menos eficaz, uma vez que não tem impacto na dinâmica da infecção da população canina, ao contrário do que acontece com a imunização (vacina) (Palatnik-de-Sousa, 2012).

Atualmente, encontram-se licenciadas para a leishmaniose canina três vacinas, duas no Brasil (Leishmune® e Leish-tec®) e uma na Europa (Canileish®). A Leishmune® foi licenciada em 2003 para profilaxia da leishmaniose canina e apresenta propriedades imunogénicas, imunoproláticas, imunoterapêuticas, conferindo proteção por, pelo menos, 3,5 anos. A Leishmune® apresenta uma eficácia de 76-80%, havendo evidências da diminuição da incidência de leishmaniose humana nas áreas endémicas onde tem sido utilizada. (Palatnik-de-Sousa, 2012). Quanto ao impacto da vacinação com Leish-tec® (licenciada em 2008) na incidência da leishmaniose canina e humana, não existem ainda estudos publicados (Evans e Kedzierski, 2011). Por último, a Canileish®, que foi licenciada em 2011 e está a ser comercializada em Portugal, Espanha, França, Grécia e Itália, apresenta uma formulação não tornada pública, mas que se sabe ser relacionada com a de uma vacina teste que apresentou uma eficácia de 92%, apesar de ser comercializada com outro adjuvante (Palatnik-de-Sousa, 2012).

Outras medidas de controle incluem a utilização de peritróides em áreas urbanas e peri-urbanas (Palatnik-de-Sousa, 2012), a redução dos micro-habitats do vetor (Solano-Gallego *et al.*, 2011), a melhoria das condições sanitárias e socioeconómicas da população (Neto *et al.*, 2009), o diagnóstico e tratamento precoce dos casos de leishmaniose humana (Palatnik-de-Sousa, 2012) e canina, e ações de sensibilização dos proprietários para o tratamento e prevenção da leishmaniose canina.

2. O tema da tese

A leishmaniose é uma doença zoonótica de transmissão essencialmente vetorial com larga distribuição mundial, afetando muitos países em diversos continentes.

Em Portugal, a leishmaniose é endémica e afeta principalmente o cão, no entanto, foram já reportados casos clínicos em outras espécies animais, incluindo o Homem. Ao longo dos últimos anos, têm vindo a ser desenvolvidas várias ações diretas e indiretas de controlo da doença na população canina, no entanto, é também sabida da existência de um ciclo silvestre de transmissão, envolvendo espécies animais, como a raposa (Abranches *et al.*, 1984) e o lobo (Sastre *et al.*, 2008). Para além destes, existe ainda a possibilidade de envolvimento de outros hospedeiros silvestres, a par do que acontece noutros países (Millán *et al.*, 2011). Deste modo, e apesar da pressão exercida sobre a população canina, a leishmaniose continua a ter uma elevada dispersão geográfica a nível nacional, e o contributo do ciclo silvestre para essa dispersão encontra-se ainda por conhecer.

O presente trabalho constitui uma contribuição para o estudo da epidemiologia das infeções por *Leishmania* spp. em Portugal, pretendendo, por um lado, caraterizar a infeção por *Leishmania* spp. no efetivo cinotécnico da Guarda Nacional Republicana e por outro, avaliar a exposição e o papel de mesocarnívoros silvestres no ciclo epidemiológico da leishmaniose em Portugal. Para tal, rastream-se por diferentes metodologias duas populações: uma silvestre, constituída por sacarrabos (*Herpestes ichneumon*), raposas (*Vulpes vulpes*), fuinhas (*Martes foina*), texugos (*Meles meles*) e genetas (*Genetta genetta*) provenientes de atropelamento (todas as espécies), de ações cinegéticas recreativas de caça menor ou de ações corretivas de densidade de predadores; e uma doméstica, constituída pelo efetivo canino da Guarda Nacional Republicana. Aferiu-se a utilidade de diferentes metodologias, serológica e/ou molecular, para a deteção de *Leishmania* spp. em diferentes matrizes de origem animal, provenientes de diferentes espécies. Após a identificação dos animais positivos, procedeu-se à tentativa de caraterização molecular dos isolados de *Leishmania* spp. através da análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição e da análise das sequências nucleotídicas de duas regiões polimórficas do genoma de *Leishmania* spp.: o ADN cinetoplastideal e a região espaçadora intergénica. A genotipagem dos isolados com base nestas regiões tinha como objetivo a comparação dos isolados obtidos de espécies domésticas com os isolados obtidos de espécies silvestres e a comparação com isolados caraterizados internacionalmente. Para além de contribuir para a avaliação de medidas profiláticas e terapêuticas no efectivo cinotécnico da GNR, esta análise sistemática, focada numa população doméstica específica e clinicamente caraterizada, sob vigilância e tratamento médico, pretendeu ainda ser uma contribuição para a compreensão de como diferentes estirpes de *Leishmania* spp. variam na sua epidemiologia, persistência e potencial patogénico em animais suscetíveis.

II MATERIAL E MÉTODOS

1. População amostrada

1.1. População canina doméstica

A população canina estudada no presente trabalho pertence ao efetivo cinotécnico da Guarda Nacional Republicana (GNR), o qual, para o cumprimento da sua missão, se encontra distribuído pelos diversos distritos do território nacional. O efetivo canino da GNR é constituído maioritariamente por cães das raças cão de Pastor Alemão e Retriever do Labrador. Todos os cães do efetivo vivem exclusivamente no exterior e fazem profilaxia sazonal a ectoparasitas, durante pelo menos, seis meses em cada ano (de março a setembro), através de coleira antiparasitária (deltametrina) ou por aplicação de solução spot-on (imidaclopride 10% (p/v) e permetrina 50% (p/v)).

Do efetivo existente e disponível, entre outubro de 2011 e dezembro de 2011, num total de 280 cães (195 machos e 85 fêmeas), foram selecionados aleatoriamente um total de 190 cães (143 machos e 47 fêmeas) com mais de três meses de idade, aos quais foram colhidas amostras de sangue periférico para imunofluorescência indireta (IFI) (Tabela II.1). A localização geográfica dos animais, indicada na Tabela II.1, diz respeito ao momento da amostragem, uma vez que o efetivo cinotécnico da GNR tem mobilidade operacional entre os vários distritos.

Tabela II.1 - Caracterização da população canina em estudo, por raça, sexo, data de nascimento e localização geográfica (distrito) à data da amostragem.

Número	Raça	Sexo	Idade (anos)	Distrito
1	Cão de Pastor Alemão	M	11	Beja
2	Cão de Pastor Alemão	M	2	Lisboa
3	Retriever do Labrador	M	6	Guarda
4	Pastor Belga Malinois	M	7	Lisboa
5	Cão de Pastor Alemão	M	9	Santarém
6	Cão de Pastor Alemão	M	1	Guarda
7	Cão de Pastor Alemão	M	10	Lisboa
8	Pastor Belga Malinois	M	1	Setúbal
9	Retriever do Labrador	F	1	Santarém
10	Cão de Pastor Alemão	M	7	Lisboa
11	Cão de Pastor Alemão	M	2	Lisboa
12	Cão de Pastor Alemão	M	8	Lisboa
13	Retriever do Labrador	F	8	Castelo Branco
14	Cão de Pastor Alemão	F	7	Lisboa
15	Cão de Pastor Alemão	M	5	Lisboa
16	Rottweiler	M	7	Castelo Branco
17	Cão de Pastor Alemão	M	1	Santarém
18	Cão de Pastor Alemão	M	6	Setúbal

19	Rottweiler	M	5	Aveiro
20	Retriever do Labrador	F	0	Castelo Branco
21	Cão de Pastor Alemão	F	8	Castelo Branco
22	Cão de Pastor Alemão	M	2	Lisboa
23	Cão de Pastor Alemão	M	7	Lisboa
24	Cão de Pastor Alemão	M	7	Castelo Branco
25	Retriever do Labrador	F	7	Lisboa
26	Cão de Pastor Alemão	M	0	Santarém
27	Retriever do Labrador	M	2	Castelo Branco
28	Cão de Pastor Alemão	M	5	Lisboa
29	Rottweiler	M	5	Lisboa
30	Rottweiler	M	8	Santarém
31	Retriever do Labrador	M	7	Setúbal
32	Cão de Pastor Alemão	M	4	Braga
33	Retriever do Labrador	F	4	Viana do Castelo
34	Retriever do Labrador	F	3	Viana do Castelo
35	Rottweiler	M	2	Aveiro
36	Cão de Pastor Alemão	M	2	Viana do Castelo
37	Golden Retriever	M	6	Aveiro
38	Rottweiler	M	6	Aveiro
39	Retriever do Labrador	M	8	Braga
40	Retriever do Labrador	M	9	Braga
41	Cão de Pastor Alemão	M	4	Braga
42	Golden Retriever	M	6	Viana do Castelo
43	Cão de Pastor Alemão	M	8	Viana do Castelo
44	Retriever do Labrador	M	9	Braga
45	Cão de Pastor Alemão	M	7	Aveiro
46	Pastor Belga Malinois	M	7	Aveiro
47	Cão de Pastor Alemão	M	6	Viana do Castelo
48	Retriever do Labrador	F	4	Faro
49	Retriever do Labrador	M	8	Faro
50	Retriever do Labrador	M	5	Faro
51	Cão de Pastor Alemão	M	9	Faro
52	Cão de Pastor Alemão	M	7	Faro
53	Retriever do Labrador	M	4	Faro
54	Cão de Pastor Alemão	M	7	Faro
55	Cão de Pastor Alemão	M	9	Faro
56	Retriever do Labrador	F	7	Faro
57	Retriever do Labrador	M	4	Faro
58	Cão de Pastor Alemão	M	6	Faro

59	Retriever do Labrador	M	4	Faro
60	Cão de Pastor Alemão	M	1	Faro
61	Retriever do Labrador	F	6	Beja
62	Rottweiler	M	7	Vila Real
63	Cão de Pastor Alemão	M	0	Coimbra
64	Cão de Pastor Alemão	M	9	Vila Real
65	Cão de Pastor Alemão	M	7	Lisboa
66	Retriever do Labrador	M	1	Vila Real
67	Pastor Belga Malinois	M	4	Lisboa
68	Cão de Pastor Alemão	F	1	Lisboa
69*	Retriever do Labrador	M	8	Vila Real
70	Cão de Pastor Alemão	M	3	Bragança
71	Retriever do Labrador	F	6	Bragança
72	Retriever do Labrador	M	10	Bragança
73	Retriever do Labrador	F	4	Viseu
74	Retriever do Labrador	M	1	Lisboa
75	Retriever do Labrador	F	1	Viseu
76	Pastor Belga Malinois	M	9	Viseu
77	Retriever do Labrador	M	1	Lisboa
78	Cão de Pastor Alemão	M	3	Bragança
79	Retriever do Labrador	F	1	Lisboa
80	Retriever do Labrador	M	2	Aveiro
81	Cão de Pastor Alemão	M	5	Leiria
82	Rottweiler	M	0	Coimbra
83	Cão de Pastor Alemão	M	8	Viseu
84	Cão de Pastor Alemão	F	6	Leiria
85*	Retriever do Labrador	M	10	Coimbra
86	Retriever do Labrador	F	2	Coimbra
87	Cão de Pastor Alemão	M	0	Coimbra
88	Retriever do Labrador	M	6	Aveiro
89	Retriever do Labrador	F	8	Viseu
90	Cão de Pastor Alemão	M	4	Viseu
91	Retriever do Labrador	F	8	Coimbra
92	Retriever do Labrador	F	3	Coimbra
93	Golden Retriever	F	8	Coimbra
94	Retriever do Labrador	M	9	Lisboa
95	Cão de Pastor Alemão	m	6	Lisboa
96	Cão de Pastor Alemão	F	5	Lisboa
97	Cão de Pastor Alemão	M	1	Lisboa

* Animal com leishmaniose, assintomático e a efetuar tratamento de manutenção.

98	Cão de Pastor Alemão	M	5	Lisboa
99	Retriever do Labrador	F	7	Setúbal
100	Rottweiler	M	11	Setúbal
101	Retriever do Labrador	F	4	Setúbal
102	Retriever do Labrador	M	8	Évora
103	Pastor Belga Malinois	M	9	Évora
104	Cão de Pastor Alemão	M	7	Beja
105*	Retriever do Labrador	M	9	Beja
106	Cão de Pastor Alemão	M	9	Beja
107	Retriever do Labrador	F	1	Évora
108	Retriever do Labrador	M	8	Évora
109	Cão de Pastor Alemão	M	9	Évora
110	Cão de Pastor Alemão	F	4	Évora
111	Pastor Belga Malinois	M	9	Guarda
112	Cão de Pastor Alemão	M	6	Guarda
113	Cão de Pastor Alemão	M	2	Faro
114	Retriever do Labrador	M	3	Lisboa
115	Cão de Pastor Alemão	M	9	Lisboa
116	Retriever do Labrador	F	1	Guarda
117	Golden Retriever	M	9	Portalegre
118	Retriever do Labrador	M	6	Porto
119	Retriever do Labrador	M	1	Porto
120	Cão de Pastor Alemão	M	6	Porto
121	Pastor Belga Malinois	M	13	Guarda
122	Cão de Pastor Alemão	M	2	Portalegre
123	Cão de Pastor Alemão	M	9	Porto
124	Retriever do Labrador	F	1	Guarda
125	Retriever do Labrador	M	8	Portalegre
126	Retriever do Labrador	M	1	Porto
127	Cão de Pastor Alemão	M	6	Porto
128	Cão de Pastor Alemão	M	9	Guarda
129	Retriever do Labrador	M	2	Porto
130	Outras	M	8	Porto
131	Cão de Pastor Alemão	M	9	Porto
132	Cão de Pastor Alemão	M	5	Lisboa
133	Rottweiler	M	4	Lisboa
134	Cão de Pastor Alemão	M	2	Lisboa
135	Rottweiler	F	6	Lisboa

* Animal com leishmaniose, assintomático e a efetuar tratamento de manutenção.

136	Cão de Pastor Alemão	M	6	Lisboa
137	Rottweiler	M	4	Lisboa
138	Outras	M	7	Lisboa
139*	Cão de Pastor Alemão	F	8	Lisboa
140	Cão de Pastor Alemão	M	8	Lisboa
141	Cão de Pastor Alemão	M	6	Lisboa
142	Cão de Pastor Alemão	M	2	Lisboa
143	Outras	M	4	Lisboa
144	Cão de Pastor Alemão	F	6	Lisboa
145	Rottweiler	M	6	Lisboa
146	Cão de Pastor Alemão	M	9	Lisboa
147	Pastor Belga Malinois	M	2	Lisboa
148	Cão de Pastor Alemão	M	6	Lisboa
149	Cão de Pastor Alemão	M	10	Lisboa
150	Pastor Belga Malinois	M	5	Lisboa
151	Cão de Pastor Alemão	M	7	Lisboa
152	Cão de Pastor Alemão	M	1	Lisboa
153	Cão de Pastor Alemão	M	2	Lisboa
154	Leão Da Rodésia	F	1	Lisboa
155	Cão de Pastor Alemão	M	6	Lisboa
156	Rottweiler	M	3	Lisboa
157	Cão de Pastor Alemão	M	3	Lisboa
158	Pastor Belga Malinois	M	6	Lisboa
159	Pastor Belga Malinois	M	0	Lisboa
160	Cão de Pastor Alemão	M	6	Lisboa
161	Pastor Belga Malinois	M	6	Lisboa
162	Outras	M	1	Lisboa
163	Cão de Pastor Alemão	M	5	Lisboa
164	Cão de Pastor Alemão	M	5	Lisboa
165	Rottweiler	F	8	Lisboa
166	Cão de Pastor Alemão	M	1	Lisboa
167	Cão de Pastor Alemão	M	2	Lisboa
168	Golden Retriever	F	8	Lisboa
169	Cão de Pastor Alemão	F	2	Lisboa
170	Cão de Pastor Alemão	M	3	Lisboa
171	Shnauzer Gigante	F	1	Lisboa
172	Pastor Belga Malinois	F	2	Lisboa
173	Retriever do Labrador	F	4	Lisboa

* Animal com leishmaniose, assintomático e a efetuar tratamento de manutenção.

174	Retriever do Labrador	M	9	Lisboa
175	Retriever do Labrador	F	3	Lisboa
176	Retriever do Labrador	M	9	Lisboa
177	Retriever do Labrador	F	4	Lisboa
178	Retriever do Labrador	F	5	Lisboa
179	Retriever do Labrador	F	3	Lisboa
180	Retriever do Labrador	M	7	Lisboa
181	Retriever do Labrador	M	3	Lisboa
182	Retriever do Labrador	F	1	Lisboa
183	Cão de Pastor Alemão	M	9	Lisboa
184	Retriever do Labrador	F	6	Lisboa
185	Retriever do Labrador	M	4	Lisboa
186	Retriever do Labrador	M	3	Lisboa
187	Cão de Pastor Alemão	F	1	Lisboa
188	Cão de Pastor Alemão	M	9	Lisboa
189	Cão de Pastor Alemão	F	3	Lisboa
190 [±]	Cão de Pastor Alemão	M	6	Portalegre

1.1. População silvestre

Neste estudo incluíram-se cento e trinta e seis mesocarnívoros silvestres (

Tabela II.2) pertencentes às famílias Herpestidae, Canidae, Mustelidae e Viverridae da ordem Carnivora, incluindo sacarrabos (*Herpestes ichneumon*, n=110), raposas (*Vulpes vulpes*, n=18), fuinhas (*Martes foina*, n=2), texugos (*Meles meles*, n=3), e genetas (*Genetta genetta*, n=3). Estes animais foram oriundos de atropelamento (todas as espécies), de ações cinegéticas recreativas de caça menor ou de ações corretivas de densidade de predadores (sacarrabos e raposas). Nenhum destes animais foi sacrificado com o propósito da realização deste estudo.

Os animais mortos por atropelamento foram recolhidos pelos técnicos de manutenção da empresa “EP-Estradas de Portugal, S.A” e doados para fins científicos no âmbito do protocolo de colaboração entre o INIAV e CBA/FCUL (Universidade de Lisboa, Centro de Biologia Ambiental, Faculdade de Ciências de Lisboa) e a “EP – Estradas de Portugal, S.A”, intitulado “*Monitorização da mortalidade de vertebrados por atropelamento nas estradas Portuguesas*”.

Os animais abatidos no âmbito do controlo de predadores resultam de ações cinegéticas devidamente autorizadas pelo Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas (ICNF), e da respetiva doação para fins científicos pelas associações/confederações que as organizam.

Após recolha ou abate, todos os animais foram preservados em sacos de plástico selados e transportados com refrigeração para um centro de recolha, onde foram mantidos a -20°C até à necrópsia. O transporte dos cadáveres foi realizado mediante autorização do ICNF (Licença nº222/2010/Trans). As coordenadas de localização (latitude, longitude) dos espécimes foram

[±] Animal com leishmaniose e sintomas de Insuficiência Renal Aguda.

registadas, o sexo determinado e a idade estimada por análise dentária. A necrópsia e a subsequente recolha de baço foram realizadas no Laboratório Nacional de Investigação e Veterinária (atual INIAV, I.P.) em instalações apropriadas. Os fragmentos de baço recolhidos foram armazenados a -20°C até posterior utilização.

Tabela II.2 - Caracterização da população silvestre em estudo por espécie, sexo, grupo etário e localização geográfica (distrito).

Amostra	Espécie	Sexo	Grupo etário	Distrito
B001	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B002	sacarrabos	M	Juvenil	Beja
B003	sacarrabos	M	Adulto	Castelo Branco
B004	sacarrabos	M	Adulto	Santarém
B005	sacarrabos	M	Adulto	Viseu
B006	sacarrabos	M	Adulto	Castelo Branco
B007	sacarrabos	F	Adulto	Coimbra
B008	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B009	sacarrabos	F	Adulto	Coimbra
B010	sacarrabos	M	Adulto	Beja
B011	raposa	nd	Adulto	Vila Real
B012	raposa	nd	Adulto	Vila Real
B013	geneta	nd	Adulto	Vila Real
b014	geneta	nd	Adulto	Vila Real
B015	fuinha	nd	Adulto	Vila Real
B016	geneta	nd	Adulto	Vila Real
B017	raposa	nd	Juvenil	Vila Real
B018	sacarrabos	F	Adulto	Lisboa
B019	sacarrabos	M	Adulto	Lisboa
B020	sacarrabos	M	Juvenil	Portalegre
B021	sacarrabos	M	Adulto	Leiria
B022	sacarrabos	F	Adulto	Portalegre
B023	sacarrabos	M	Adulto	Évora
B024	sacarrabos	M	Adulto	Portalegre
B025	fuinha	M	Adulto	Aveiro
B026	sacarrabos	M	Juvenil	Évora
B027	sacarrabos	F	Adulto	Lisboa
B028	sacarrabos	M	Adulto	Lisboa
B029	sacarrabos	M	Adulto	Lisboa
B030	sacarrabos	F	Adulto	Viseu
B031	sacarrabos	M	Adulto	Évora
B032	sacarrabos	F	Adulto	Lisboa
B033	sacarrabos	M	Adulto	Lisboa
B034	sacarrabos	F	Adulto	Évora
B035	sacarrabos	M	Adulto	Beja
B036	sacarrabos	M	Adulto	Santarém

B037	sacarrabos	M	Juvenil	Beja
B038	sacarrabos	M	Adulto	Beja
B039	sacarrabos	M	Adulto	Beja
B040	sacarrabos	M	Adulto	Évora
B041	sacarrabos	M	Adulto	Beja
B042	sacarrabos	M	Adulto	Évora
B043	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B044	sacarrabos	M	Juvenil	Beja
B045	sacarrabos	M	Adulto	Beja
B046	raposa	F	Adulto	Coimbra
B047	texugo	nd	Adulto	Santarém
B048	sacarrabos	F	Adulto	Coimbra
B049	sacarrabos	F	Adulto	Santarém
B050	sacarrabos	M	Adulto	Viseu
B051	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B052	sacarrabos	M	Juvenil	Coimbra
B053	sacarrabos	M	Juvenil	Beja
B054	sacarrabos	M	Adulto	Castelo Branco
B055	sacarrabos	F	Adulto	Viseu
B056	sacarrabos	M	Adulto	Santarém
B057	sacarrabos	M	Adulto	Santarém
B058	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B059	sacarrabos	F	Juvenil	Beja
B060	sacarrabos	F	Adulto	Évora
B061	sacarrabos	F	Adulto	Évora
B062	raposa	M	nd	Nd
B063	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B064	raposa	M	nd	Nd
B065	raposa	F	nd	Nd
B066	raposa	nd	Adulto	Vila Real
B067	texugo	nd	Adulto	Vila Real
B068	sacarrabos	M	Adulto	Beja
B069	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B070	sacarrabos	F	Sub-adulto	Beja
B071	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B072	sacarrabos	M	Adulto	Beja
B073	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B074	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B075	sacarrabos	M	Adulto	Beja
B076	sacarrabos	M	Adulto	Castelo Branco
B077	sacarrabos	M	Adulto	Faro
B078	sacarrabos	M	Sub-adulto	Beja
B079	sacarrabos	M	Adulto	Beja
B080	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B081	sacarrabos	M	Juvenil	Beja

B082	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B083	sacarrabos	F	Sub-adulto	Beja
B084	sacarrabos	F	Juvenil	Beja
B085	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B086	raposa	F	Adulto	Évora
B087	raposa	F	Adulto	Évora
B088	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B089	sacarrabos	M	Sub-adulto	Beja
B090	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B091	sacarrabos	M	Adulto	Portalegre
B092	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B093	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B094	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B095	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B096	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B097	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B098	sacarrabos	M	Adulto	Viseu
B099	sacarrabos	M	Adulto	Viseu
B100	sacarrabos	M	Sub-adulto	Portalegre
B101	sacarrabos	M	Sub-adulto	Beja
B102	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B103	sacarrabos	M	Sub-adulto	Portalegre
B104	sacarrabos	F	Sub-adulto	Beja
B105	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B106	sacarrabos	F	Adulto	Faro
B107	sacarrabos	M	Juvenil	Santarém
B108	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B109	sacarrabos	M	Adulto	Beja
B110	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B111	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B112	sacarrabos	M	Sub-adulto	Faro
B113	sacarrabos	F	Adulto	Beja
B114	sacarrabos	F	Adulto	Santarém
B115	sacarrabos	M	Adulto	Castelo Branco
B116	sacarrabos	M	Adulto	Coimbra
B117	raposa	nd	nd	Nd
B118	sacarrabos	F	Adulto	Viseu
B119	sacarrabos	M	Sub-adulto	Faro
B120	sacarrabos	F	Adulto	Coimbra
B121	sacarrabos	M	Sub-adulto	Faro
B122	sacarrabos	F	Adulto	Castelo Branco
B123	sacarrabos	M	Sub-adulto	Santarém
B124	sacarrabos	M	Adulto	Santarém
B125	sacarrabos	F	Adulto	Castelo Branco
B126	sacarrabos	F	Adulto	Coimbra

B127	sacarrabos	M	Adulto	Coimbra
B128	texugo	F	Cria	Santarém
B129	raposa	F	Adulto	Guarda
B130	raposa	M	Adulto	Santarém
B131	raposa	F	Adulto	Aveiro
B132	raposa	F	Adulto	Évora
B133	raposa	nd	Adulto	Castelo Branco
B134	raposa	M	Adulto	Guarda
B135	raposa	nd	Adulto	Castelo Branco
B136	sacarrabos	nd	Adulto	Guarda

nd – não determinado

2. Pesquisa de *Leishmania* spp. na população amostrada

A presença de *Leishmania* spp. na população canina em estudo foi analisada preliminarmente por imunofluorescência indireta. Os animais seropositivos ou duvidosos foram posteriormente rastreados por métodos moleculares.

Dado o material biológico existente, a população silvática em estudo foi rastreada somente por métodos moleculares.

2.1. Imunofluorescência indireta (IFI)

Todos os cães em estudo foram testados por imunofluorescência indireta. Para tal, foi feita colheita de sangue periférico por punção da veia cefálica ou da veia safena. A colheita foi efetuada para um tubo seco e o sangue centrifugado a 8.000 rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. O soro sanguíneo obtido foi transferido para um microtubo e conservado a -20°C até ser processado. Cada amostra de soro sanguíneo foi testada na proporção de 1:50 e 1:100, após diluição em PBS 1x (9,1g de NaH₂PO₄ e 17,88g de Na₂HPO₄ em 1000 ml de água destilada a pH 7,2).

As lâminas de vidro utilizadas continham uma cultura imobilizada de promastigotas de *Leishmania infantum*, obtidas a partir de cultura própria do LNIV. A cada campo de reação da lâmina (poço) foi adicionado 25 µl de soro a testar, diluído de 1:50 e 1:100, seguindo-se um período de incubação de 30 minutos a 37°C, sem agitação. Após a incubação, seguiram-se duas lavagens das lâminas durante 5 minutos por imersão em PBS 1x e com suave agitação orbital. Após a lavagem, as lâminas foram secas por fluxo de ar frio (secador), e a cada campo de reação foi adicionado 25 µl de uma solução de conjugado em Azul de Evans (Anti-IgG de cão marcado com FITC (F-4012, Sigma®) a 1:200 em Azul de Evans a 1:200.000 em PBS), seguindo-se novo período de incubação de 30 minutos a 37°C. Depois da incubação, repetiram-se as lavagens e secagens nas condições acima descritas. Os campos de reação foram preenchidos com glicerina tamponada (glicerina 9:1 em PBS), seguindo-se a colocação de uma lamela. A lâmina foi observada por microscopia de fluorescência com uma ampliação de 400 vezes em microscópio Zeiss Axioscop 20.

Os resultados obtidos na IFI foram analisados estatisticamente por grupo etário, raça, género e localização geográfica através do teste do qui-quadrado.

2.2. Citologia medular e exame clínico

Os cães seropositivos ou duvidosos à prova de IFI foram sujeitos a exame clínico e a punção aspirativa por agulha fina de medula óssea. A punção medular foi realizada na junção costo-condral e o material obtido foi corado de acordo com o protocolo do fabricante Hemacolor® Merck.

A observação microscópica da citologia foi realizada com uma ampliação de 400x no microscópio Nikon eclipse 50i.

2.3. Métodos moleculares

Os cães seropositivos ou duvidosos à prova de IFI e a população silvática em estudo foram rastreados para a presença de *Leishmania* spp., com recurso a métodos moleculares baseados na amplificação de ADN de regiões alvo selecionadas mediante a reação em cadeia da polimerase (PCR). Para o efeito, extraíu-se ADN de medula óssea no caso dos cães, obtida por punção na região costo-condral, e ADN de baço no caso dos carnívoros silvestres. A fim de se excluir a presença de inibidores da reação de PCR, procedeu-se à deteção de um fragmento do gene da β -actina de mamíferos, usando-se para o efeito sequências iniciadoras desenhadas com base em regiões consenso das espécies animais em estudo (Ferreira *et al.*, 2010).

2.3.1. Extração de ADN total mediante utilização de sistemas comerciais

O ADN total de medula ou baço foi extraído a partir de 25 mg de tecido por recurso a dois sistemas comerciais: *High Pure PCR Template Preparation* da Roche e QIAamp® DNA mini kit da Quiagen, seguindo as instruções dos respetivos fabricantes.

O ADN obtido foi quantificado e a sua pureza determinada por espectrofotometria, utilizando o equipamento Thermo Scientific Nanodrop 2000.

2.3.1.1. Extração de ADN por recurso ao sistema *High Pure PCR Template Preparation* da Roche

Adicionou-se a um microtubo de 1,5 ml 25 mg de amostra, 200 μ l de tampão de lise e 40 μ l de proteinase K. A suspensão resultante foi brevemente agitada e incubada durante 1h a 3h a 55°C, sem agitação, vortexando-se periodicamente. De seguida, adicionou-se 200 μ l de tampão de ligação, misturou-se e incubou-se por 10 minutos a 70°C. Após a incubação, foi adicionado 100 μ l de isopropanol, seguindo-se nova agitação. Esta solução foi depois transferida para o reservatório superior da coluna de filtração fornecida pelo sistema comercial e foi feita uma centrifugação a 8.000 x g, durante 1 minuto. Após esta operação, o tubo coletor foi substituído e adicionou-se 500 μ l de tampão de remoção ao reservatório superior da coluna de filtração, seguindo-se nova centrifugação a 8.000 x g, durante 1 minuto. De seguida, foram efetuadas duas lavagens com 500 μ l de tampão de lavagem cada, e centrifugou-se a 8.000 x g, durante 1 minuto. Por fim, descartou-se o tubo coletor, seguindo-se a colocação de novo tubo de microcentrifugação e a adição de 150 μ l de tampão de eluição à coluna de filtração. Seguiu-se nova centrifugação a 8.000 x g, durante 1 minuto, para eluição do ADN.

2.3.1.2. Extração de ADN por recurso ao sistema comercial *QIAamp® DNA Mini kit* da Quiagen

Adicionou-se a um microtubo de 1,5ml 25 mg de amostra, 180 µl de tampão ATL e 20 µl de proteinase K, agitou-se e colocou-se a incubar durante 3 h a 56°C. De seguida, foi feita uma centrifugação breve para remover gotas da tampa e adicionou-se 200 µl de tampão de ligação AL, nova mistura e incubação por 10 minutos a 70°C. Após a incubação, foi adicionado 200 µl de etanol (96-100%) e agitou-se por 15 segundos. Esta solução foi depois transferida para o reservatório superior da coluna de filtração e foi feita uma centrifugação a 6.000 x g, durante 1 minuto. Após esta operação, o tubo coletor foi substituído e adicionado 500 µl de tampão AW1 ao reservatório superior da coluna de filtração e feita uma nova centrifugação a 6.000 x g durante 1 minuto. De seguida, foi feita uma lavagem com 500 µl de tampão AW2, seguindo-se a centrifugação a 20.000 x g durante 3 minutos. Por fim, o tubo coletor foi novamente substituído por um tubo de microcentrifugação de 1,5ml e foi adicionado 150 µl de tampão AE à coluna de filtração, seguindo-se nova centrifugação a 6.000 x g durante 1 minuto para eluição do ADN.

2.3.2. Amplificação de um fragmento do gene da β -actina por PCR

Após a extração do ADN procedeu-se à deteção e amplificação de um fragmento de 289 pares de bases (pb) (Breuil *et al.*, 1993) da β -actina, por PCR convencional, e mediante a utilização das sequências oligonucleotídicas iniciadoras Actin-FWD e Actin-REV (Ferreira *et al.*, 2010), descritas na Tabela II.3. Cada reação de 25 µl, continha 150 ng de ADN molde, 5 µl de tampão de reação da polimerase (Green Gotaq Flexi Buffer 5x, Promega), 2,5 µl de dimetilsulfóxido (DMSO), 0,5 µl de uma solução de dNTPs 10 mM, 1,25 µl de uma solução de cada sequência iniciadora 10 µM, 2 µl de uma solução de cloreto de magnésio (MgCl₂) 25 mM, 1 U de GoTaq Flexi ADN polimerase (Promega®) e água desmineralizada e esterilizada.

Tabela II.3 - Caracterização das sequências iniciadoras utilizadas na amplificação do fragmento do gene da β -actina

Nome	Sequência iniciadora	Tamanho do produto amplificado	Temp ^a de hibridação	Referência bibliográfica
Actin-FWD	5'-CGGAACCGCTCATTGCC-3'	289 pb	57°C	(Ferreira <i>et al.</i> , 2010)
Actin-REV	5'-ACCCACACTGTGCCATCTA-3'			

As condições utilizadas para a amplificação por PCR foram as seguintes: desnaturação inicial de 4 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de: 30 segundos a 94°C (desnaturação), 30 segundos a 57°C (hibridação), um minuto a 72°C (elongação); seguindo-se um passo final de extensão durante 5 minutos a 72°C (Ferreira *et al.*, 2010). O termociclador utilizado para o efeito foi o MJ Mini da BioRad. Em todas as reações de amplificação foi utilizada uma amostra de ADN de mamífero, como controlo positivo, e água, como controlo negativo.

A eletroforese dos produtos de reação foi feita em gel de agarose (Seakem®LE Agarose) 2% (p/v) preparado em tampão TBE 1× (TBE 5x: 0,89 M de Tris Base; 0,89 M de ácido bórico; 0,5 M de EDTA, pH 8.0), ao qual por cada 200ml se adicionou 5 µl de brometo de etídeo a 0.3 µg/ml para visualização dos produtos amplificados. A separação eletroforética foi realizada durante 60 minutos a 90 volts e a visualização efetuada no transluminador Bio Doc-it™ Imaging System. Como padrão de massas moleculares usou-se o Hyperladder IV da Biorline.

As amostras que, nas condições acima descritas, não apresentaram amplificação do gene alvo foram novamente sujeitas a reação de PCR nas condições acima descritas, mas utilizando-se menor quantidade de ADN (100 ng).

2.3.3. Amplificação de um fragmento de ADN cinetoplastideal por PCR

As amostras nas quais se verificou amplificação do gene da β -actina e, portanto, sem inibidores da reação de PCR na concentração testada, foram seguidamente testadas por PCR convencional para a presença de ADN de *Leishmania* spp. com base na amplificação de um fragmento de 447 pb do ADN cinetoplastideal (KDNA), do qual 42 pb correspondem à região conservada do minicírculo e 405 pb à região variável (Cortes, 2008). Os oligonucleótidos iniciadores utilizados (Tabela II.4) designam-se de MC1-FWD, que hibrida na região variável, e MC2-REV, que apresenta elevada homologia com a região conservada do minicírculo (Cortes S. J., 2008).

Cada reação de 25 µl, continha 100 ou 150 ng de ADN molde, 5 µl de tampão de reação da polimerase (Green Gotaq Flexi Buffer 5x, Promega), 0,5 µl de uma solução de dNTPs 10 mM, 0,625 µl de uma solução de cada sequência iniciadora 20 µM, 2,5 µl de uma solução de cloreto de magnésio (MgCl₂) 25 mM, 1 U de GoTaq Flexi ADN polimerase (Promega®) e água desmineralizada e esterilizada.

Tabela II.4 - Caracterização das sequências oligonucleotídicas iniciadoras utilizadas na amplificação de um fragmento de ADN cinetoplastideal.

Nome	Sequência iniciadora	Tamanho do produto amplificado	Temp ^a de hibridação	Referência bibliográfica
MC1-FWD	5'-GTTAGCCCGATGGTGGTCTTG-3'	447pb	55°C	(Cortes <i>et al.</i> , 2006)
MC2-REV	5'-CACCCATTTTCCGATTTTG-3'			

As condições utilizadas para a reação de amplificação por PCR foram as seguintes: desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos de: 40 segundos a 94°C (desnaturação), 20 segundos a 55°C (hibridação), 30 segundos a 72°C (elongação); seguindo-se um passo de extensão final de 5 minutos a 72°C. O termociclador utilizado para o efeito foi o MJ Mini BioRad.

Em todas as amplificações foi utilizado um controlo positivo contendo ADN genómico de *L. infantum* extraído de um isolado de cão e um controlo negativo contendo água destilada, desionizada e estéril. A eletroforese dos produtos de reação foi feita em gel de agarose (Seakem®LE Agarose) 2% (p/v) preparado em tampão TBE 1×, ao qual por cada 200ml se adicionou 5 µl de brometo de etídeo a

0.3 µg/ml para visualização dos produtos amplificados. A separação eletroforética foi realizada durante 90 minutos a 90 volts e a visualização efetuada no transluminador Bio Doc-it™ Imaging System. Como padrão de massas moleculares, usou-se o Hyperladder IV da Biotin.

As amostras negativas foram de novo testadas nas seguintes condições: desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos de: 20 segundos a 94°C (desnaturação), 20 segundos a 60°C (hibridação), 30 segundos a 72°C (elongação); seguindo-se um passo de extensão final de 5 minutos a 72°C.

2.3.4. Amplificação da região espaçadora intergénica (ITS-1)

As amostras da população doméstica que foram positivas ou duvidosas na IFI foram, seguidamente, testadas por PCR convencional e por PCR em tempo real, para a presença de ADN de *Leishmania* spp. com base na amplificação de um fragmento de 300 a 350 pb, correspondente à região espaçadora não codificante ITS-1, que se encontra no operão ribossomal, entre a região codificadora do rRNA 18S e a região codificadora do rRNA 5,8S.

Apesar de, nalguns estudos, estas sequências iniciadoras (Tabela II.5) parecerem específicas para o género *Leishmania*, a análise pelo software *primer-Blast* indica que as mesmas podem amplificar regiões de outros tripanossomatídeos, incluindo *T. cruzi*, com produtos que variam de 300 a 760 pb de tamanho (Lopes da Silva *et al.*, 2010).

As amostras de mesocarnívoros silvestres positivas à amplificação de um fragmento de ADN cinetoplastideal por PCR foram também testadas para a amplificação da região espaçadora intergénica (ITS-1) por PCR em tempo real.

2.3.4.1. Amplificação da região espaçadora intergénica (ITS-1) por PCR convencional

Cada reação de 25 µl, continha 5 µl de ADN molde, 5 µl de tampão de reação da polimerase (Green Gotaq Flexi Buffer 5x, Promega), 0,5 µl de uma solução de dNTPs 10 mM, 1,25 µl de uma solução de cada sequência iniciadora 10 µM (Tabela II.5), 3 µl de uma solução de cloreto de magnésio (MgCl₂) 25 mM, 1 U de GoTaq Flexi ADN polimerase (Promega®) e água desmineralizada e esterilizada.

As condições utilizadas para a amplificação por PCR foram as seguintes: desnaturação inicial de 2 minutos a 95°C, seguido de 32 ciclos de: 20 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos a 53°C (hibridação), um minuto a 72°C (elongação); seguindo-se um passo final de extensão durante 6 minutos a 72°C. O termociclador utilizado para o efeito foi o MJ Mini da BioRad. Em todas as reações de amplificação, foi utilizada uma amostra de ADN de mamífero, como controlo positivo, e água, como controlo negativo.

A eletroforese dos produtos de reação foi feita em gel de agarose (Seakem®LE Agarose) 2% (p/v) preparado em tampão TBE 1x (TBE 5x: 0,89 M de Tris Base; 0,89 M de ácido bórico; 0,5 M de EDTA, pH 8.0), ao qual por cada 200ml se adicionou 5 µl de brometo de etídeo a 0.3 µg/ml para visualização dos produtos amplificados. A separação eletroforética foi realizada durante 60 minutos a 90 volts e a

visualização efetuada no transluminador Bio Doc-it TMImaging System. Como padrão de massas moleculares, usou-se o Hyperladder IV da Bioline.

2.3.4.2. Amplificação da região espaçadora intergénica (ITS-1) por PCR em tempo real

As amostras dos mesocarnívoros silvestres, que apresentaram amplificação de ADN cinetoplastideal, e as amostras dos mesocarnívoros domésticos, com IFI positiva ou duvidosa, foram ainda testadas por um método presumivelmente mais sensível baseado na amplificação em tempo real e utilizando o corante intercalante *EvaGreen*® (BioRad).

Cada reação de 20 µl continha, 100 a 200 ng de ADN, 10 µl do reagente Supermix SsoFastTM *EvaGreen*® (BioRad), 0,6µl de cada sequência iniciadora 0,3 µM (Tabela II.5) e água desmineralizada e esterilizada.

Tabela II.5 - Caracterização das sequências iniciadoras utilizadas na amplificação da região espaçadora intergénica (ITS)

Nome	Sequência iniciadora	Tamanho do produto amplificado	Temp ^a de ligação	Referência bibliográfica
LITSR	5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'	300 a 350 pb	53°C	(El Tail <i>et al.</i> , 2000)
L5.8S	5'-CTGGATCATTTCGATG-3'			

As condições utilizadas no termociclador CFX96TM (BioRad) para a amplificação por PCR em tempo real foram as seguintes: pré-desnaturação de 2 minutos a 95°C, seguido de 34 ciclos de 20 segundos a 95°C (desnaturação), 30 segundos a 53°C (hibridação) e 30 segundos a 72°C (elongação). Em todas as amplificações foi utilizado como controlo positivo ADN genómico de *L. infantum*, extraído de um isolado de cão e água estéril, como controlo negativo.

A eletroforese dos produtos de reação foi feita em gel de agarose (Seakem®LE Agarose) 2% (p/v) preparado em tampão TBE 1x, ao qual por cada 200ml se adicionou 5 µl de brometo de etídeo a 0.3 µg/ml para visualização dos produtos amplificados. A separação electroforética foi realizada durante 90 minutos a 90 volts e como padrão de massas moleculares, usou-se o Hyperladder IV da Bioline. A visualização foi efetuada no transluminador Bio Doc-it TMImaging System.

Os resultados das reacções de PCR em tempo real foram analisados utilizando o programa *CFX Manager*TM (versão 1.5, BioRad).

3. Genotipagem dos isolados de *Leishmania* spp. por análise do polimorfismo dos fragmentos restrição dos produtos amplificados

A genotipagem dos isolados baseou-se na análise dos perfis de restrição dos fragmentos dos genes amplificados. Os produtos de PCR com tamanho correspondente ao fragmento alvo (verificado em gel de agarose por comparação com o padrão de massas moleculares) foram sujeitos, separadamente, a restrição com enzimas selecionadas (*RsaI*, *HpaII*, *PstI*, *DdeI* e *BglII*) para o ADN

cinetoplastideal (Cortes, 2008) e com a enzima *HaeIII* para o ADN da região espaçadora intergênica (Dweik *et al.*, 2007). Cada reação de hidrólise foi feita num volume de 20 µl, contendo 10 U da endonuclease respetiva, 1x tampão de reação específico para cada endonuclease (concentrado 10x), 6-10 µl de ADN amplificado por PCR e água ultra-pura estéril, até completar o volume final. A incubação foi realizada a +37°C, durante três horas.

A eletroforese dos produtos de reação foi feita em gel de agarose (Seakem®LE Agarose) 3% (p/v) preparado em tampão TBE 1x, ao qual por cada 200 ml se adicionou 5 µl de brometo de etídeo a 0.3 µg/ml para visualização dos produtos amplificados. A separação eletroforética foi realizada durante 2 a 3 horas a 90 volts e a visualização efetuada no transluminador Bio Doc-it™ Imaging System. Como padrão de massas moleculares, usou-se o 50 bp ADN Ladder (Promega®) e o 25 bp ADN Step Ladder (Promega®).

4. Análise das sequências nucleotídicas amplificadas

A análise das sequências nucleotídicas amplificadas permite relacionar ao nível da espécie as estirpes identificadas. Para tal, os fragmentos amplificados e separados em gel de agarose foram recuperados por recurso ao sistema comercial *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit* da GE Healthcare, a fim de serem sequenciados comercialmente por sequenciação de sanger (STAB VIDA). A análise das sequências obtidas, a elaboração das sequências de consenso e o alinhamento de sequências nucleotídicas foram feitas com recurso a ferramentas bioinformáticas (*FintchTV 1.4.0*, *Genedoc 2.7.000* e *BLAST*), de forma a comparar-se as sequências obtidas com as sequências nucleotídicas depositadas na base de dados *Genbank* do NCBI (Nucleotide collection).

4.1. Recuperação de ADN a partir de bandas do gel por recurso ao sistema comercial *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* da GE Healthcare

Após realização da electroforese e visualização da banda de interesse no transluminador procedeu-se à sua remoção do gel de agarose, com o auxílio de um bisturi estéril, e transferiu-se para um microtubo estéril.

De acordo com o protocolo do fabricante para purificação de ADN a partir de géis de agarose preparados com TBE ou TAE, adicionou-se 500 µL do tampão de captura a cada tubo contendo o pedaço de agarose excisado do gel, misturando-se por inversão e incubando-se os tubos num banho-maria a 60±1°C, durante 15 a 30 minutos (a cada 3 minutos os tubos foram agitados por inversão). Quando a agarose solubilizou por completo confirmou-se que todas as soluções tinham uma cor amarela, de acordo com as indicações do fornecedor. Para cada reação de purificação colocou-se uma coluna *GFX MicroSpin* dentro de um tubo de recolha. As soluções de cor amarela foram centrifugadas brevemente (centrífuga *Scan Speed 1730R*, *LaboGene*), de modo a recolher o líquido no fundo do tubo, transferindo-se até 800 µL de cada solução para a coluna respetiva e incubando-se à temperatura ambiente durante 1 minuto. Cada conjunto coluna/tubo de recolha foi submetido a centrifugação a 16000 x g durante 30 segundos. O líquido recolhido foi descartado e a coluna

colocada novamente no interior do tubo de recolha. De seguida, adicionou-se 500 µL do tampão de lavagem à coluna e realizou-se nova centrifugação a 16000 x g durante 30 segundos. Repetiu-se o passo de lavagem, descartando-se o líquido recolhido. Procedeu-se a uma centrifugação adicional de 30 segundos a 16000 x g, de modo a remover resíduos da solução de lavagem da coluna GFX. O tubo de recolha foi depois descartado e a coluna transferida para um microtubo estéril. Para eluir o ADN, adicionou-se no centro da membrana da coluna 30 a 50 µL de água estéril livre de nucleases (Elution buffer type 6 existente no kit). Incubou-se à temperatura ambiente durante 1 minuto, procedendo-se de seguida a uma centrifugação a 16000 x g durante 1 minuto para recolher o ADN purificado que foi armazenado a - 20°C.

III RESULTADOS

1. População amostrada

1.1. Caracterização da população canina amostrada

A maioria dos cães do efetivo cinotécnico amostrada neste estudo pertence à raça cão de Pastor Alemão (45%) e à raça Retriever do Labrador (34%) (Figura III-I).

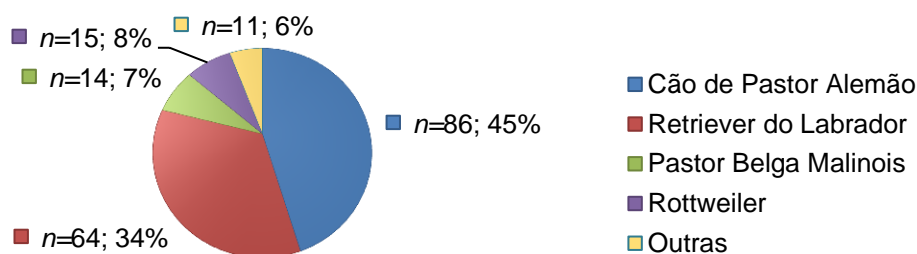


Figura III-I - Distribuição dos cães em estudo por raça

Considerando o tempo de vida médio de cada animal no serviço policial (até aos 9-10 anos idade), foram constituídos três grupos etários: o primeiro (I), até aos 3 anos de idade; o segundo (II), dos 3 aos 7 anos de idade; e o terceiro (III), dos 7 anos em diante. Dos 190 cães amostrados, 48 (25%) inserem-se no grupo I, 70 (37%) no grupo II, e 72 (38%) no grupo III (Figura III-II).

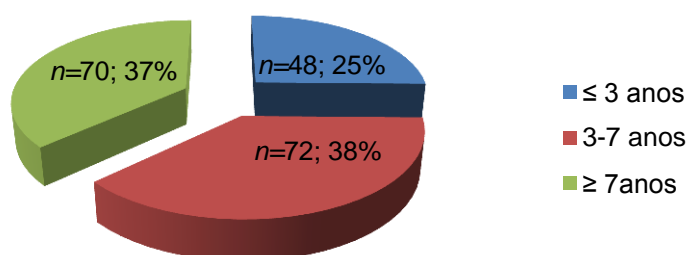


Figura III-II - Distribuição dos cães em estudo por grupo etário

A distribuição geográfica dos cães amostrados no presente trabalho, à data da colheita de soro para análise, incluiu todos os distritos do território continental, de acordo com a Tabela III.1.

Tabela III.1 - Distribuição geográfica dos cães amostrados por distrito

Distrito	Número de cães amostrados	Proporção relativa na amostra (%)
Aveiro	8	4,21
Beja	5	2,63
Braga	5	2,63
Bragança	4	2,11
Castelo Branco	6	3,16
Coimbra	8	4,21
Évora	6	3,16
Faro	14	7,37
Guarda	8	4,21
Leiria	2	1,05
Lisboa	84	44,2
Portalegre	4	2,11
Porto	9	4,74
Santarém	5	2,63
Setúbal	6	3,16
Viana do Castelo	6	3,16
Vila Real	4	2,11
Viseu	6	3,16
Total	190	100

A maioria dos cães amostrados pertence ao distrito de Lisboa, local onde também se encontra a maioria do efetivo cinotécnico da GNR (Figura III-III).

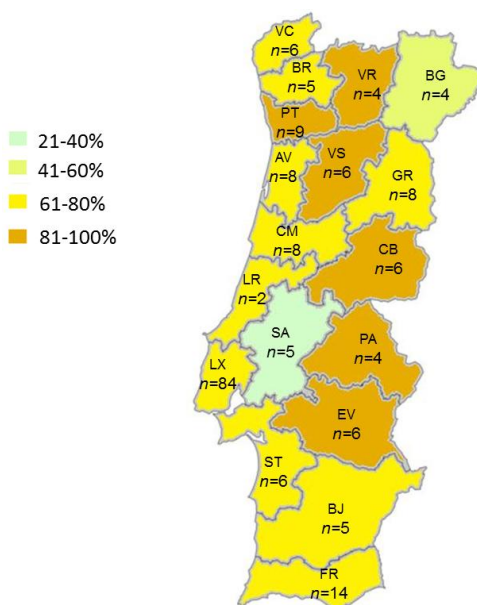


Figura III-III - Distribuição geográfica e número de cães do efetivo cinotécnico da GNR amostrados no presente trabalho. A percentagem de indivíduos amostrados no efetivo de cada distrito de Portugal Continental encontra-se representada a cores, de acordo com a escala indicada. Abreviaturas: Viana do Castelo (VC), Braga (BR), Vila Real (VR), Bragança (BG), Porto (PT), Aveiro (AV), Viseu (VS), Guarda (GR), Coimbra (CM), Castelo Branco (CB), Leiria (LR), Santarém (SA), Portalegre (PA), Lisboa (Lx), Setúbal (ST), Évora (EV), Beja (BJ) e Faro (FR).

A percentagem de cães amostrados variou entre 63,64 e 82,60% do efetivo cinotécnico, nas diferentes unidades territoriais para estatística (Tabela III.2).

Tabela III.2 - Distribuição geográfica e número de cães do efetivo cinotécnico da GNR por Unidade Territorial Estatística (NUTS)

Unidade Territorial Estatística	Número de cães amostrados	Número de cães existentes no efetivo	Percentagem da amostragem (%)
Norte	28	36	77,78
Centro	38	46	82,60
Lisboa e Vale do Tejo	89	139	64,03
Alentejo	21	26	80,77
Algarve	14	22	63,64
Totais	190	269	70,63

1.2. Caracterização da população silvestre amostrada

A população silvestre estudada foi constituída por 136 espécimes de diferentes espécies. A maioria dos animais silvestres foi da espécie sacarrabos (*Herpestes ichneumon*) ($n=110$; 81%), seguida da espécie raposa (*Vulpes vulpes*) ($n=18$; 13%) (Figura III-IV). As restantes espécies analisadas foram: o texugo (*Meles meles*), a geneta (*Genetta genetta*) e a fuinha (*Martes foina*).

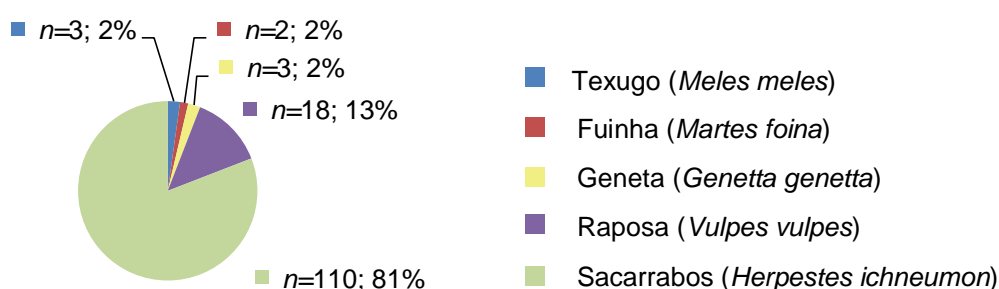


Figura III-IV - Distribuição por espécie dos animais silvestres analisados

A população de mesocarnívoros silvestres amostrada foi agrupada em quatro faixas etárias: cria, juvenil, sub-adulto e adulto, de acordo com a morfometria (peso e comprimento) e a análise dentária de cada espécime analisado*. A subpopulação em análise é maioritariamente constituída por indivíduos adultos (78%) (Figura III-V).

A população silvestre amostrada encontra-se distribuída por diversos distritos do território continental, de acordo com a Tabela III.3.

* Em quatro animais não foi possível determinar a faixa etária.

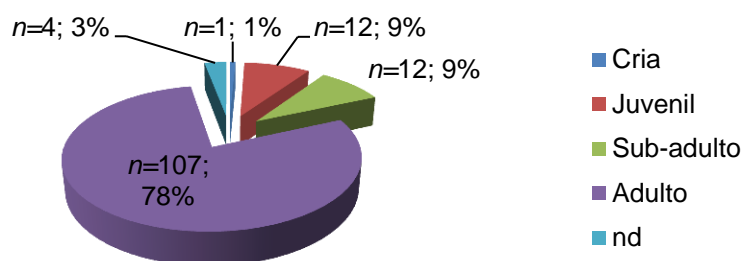


Figura III-V - Distribuição por faixa etária dos animais silvestres amostrados. Nd – não determinado.

Tabela III.3 - Distribuição da população silvestre amostrada por distrito.

Distrito	Número de amostras	Proporção relativa na amostra (%)
Aveiro	2	1,47
Beja	51	37,50
Castelo Branco	9	6,62
Coimbra	9	6,62
Évora	11	8,09
Faro	5	3,68
Guarda	3	2,21
Leiria	1	0,74
Lisboa	7	5,15
Portalegre	6	4,41
Santarém	12	8,82
Vila Real	9	6,62
Viseu	7	5,15
nd	4	2,94
Total	136	100

A maioria dos animais amostrados pertence ao distrito de Beja ($n=51$, 37,50%) (Figura III-VI), representando a Unidade Territorial Estatística do Alentejo cerca de 50% da amostragem efetuada (Tabela III.4).

Tabela III.4 - Distribuição geográfica e proporção relativa dos animais silvestres amostrados nas diferentes Unidades Territoriais Estatísticas.

Unidade Territorial Estatística	Número de animais silvestres amostrados	Proporção relativa na amostragem (%)
Norte	9	6,62
Centro	31	22,79
Lisboa e Vale do Tejo	19	13,97
Alentejo	68	50,00
Algarve	5	3,68
Não Identificado	4	2,94
Totais	136	100

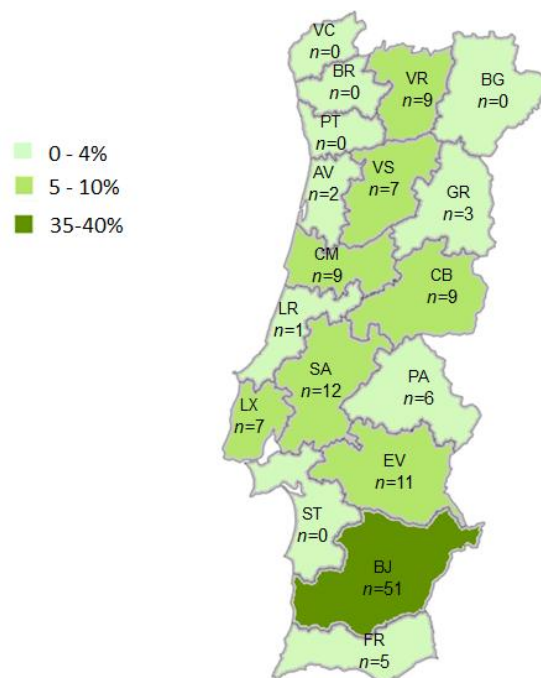


Figura III-VI - Distribuição geográfica e número de animais silvestres amostrados no presente trabalho. A proporção relativa de indivíduos amostrados por distrito em Portugal Continental encontra-se representada a cores, de acordo com a escala indicada. Abreviaturas: Viana do Castelo (VC), Braga (BR), Vila Real (VR), Bragança (BG), Porto (PT), Aveiro (AV), Viseu (VS), Guarda (GR), Coimbra (CM), Castelo Branco (CB), Leiria (LR), Santarém (SA), Portalegre (PA), Lisboa (Lx), Setúbal (ST), Évora (EV), Beja (BJ) e Faro (FR).

Das espécies silvestres presentes neste estudo apenas raposa (*Vulpes vulpes*) foi anteriormente descrita como portadora de *Leishmania* spp. em Portugal (Abranches *et al.*, 1984). A distribuição geográfica da população de raposas amostradas neste estudo é mostrada na Tabela III.5.

Tabela III.5 - Distribuição geográfica e proporção relativa das raposas amostradas.

Distrito	Número de amostras	Proporção relativa (%)
Aveiro	1	5,56
Castelo Branco	2	11,11
Coimbra	1	5,56
Évora	3	16,67
Guarda	2	11,11
Santarém	1	5,56
Vila Real	4	22,22
Não identificado	4	22,22
Total	18	100

2. Pesquisa de *Leishmania* spp. nas populações amostradas

2.1. Rastreio serológico efetuado por imunofluorescência indireta à população canina doméstica

Neste estudo analisaram-se por imunofluorescência indireta (IFI) 190 amostras de soro sanguíneo, provenientes de cães do efetivo cinotécnico da GNR. Esta análise serológica incluiu cinco animais nos quais se tinha previamente diagnosticado leishmaniose, e que se encontravam em tratamento de seguimento à data da colheita de sangue. As amostras que apresentaram um título igual ou superior a 1:100 foram consideradas positivas e as amostras com fluorescência basal ou fluorescência de fraca intensidade, não consistente em todos os ensaios, foram consideradas duvidosas (Rebêlo, 1988).

Das amostras analisadas, obtiveram-se 10 positivas, seis duvidosas e 174 negativas (Tabela III.6). Entre os animais sujeitos a tratamento, verificou-se que dois eram seropositivos (amostras 103 e 190) e os restantes negativos (amostras 69, 85 e 139).

Tabela III.6 - Seroprevalência de *Leishmania* spp. por grupo etário, sexo e raça

	Total	Seropositivos (N)	Seroprevalentes (%)
Faixa etária			
<3anos	48	3	6,25
3-7 anos	72	2	2,78
> 7 anos	70	5	7,14
Sexo			
Macho	143	9	6,29
Fêmea	47	1	2,13
Raça			
Cão de Pastor Alemão	86	6	6,98
Retriever do Labrador	64	3	4,69
Pastor Belga Malinois	14	1	7,14
Rottweiler	15	0	0,00
Outras	11	0	0,00

A seroprevalência média de *Leishmania* spp. na população em estudo foi de 5,26%. Considerando a análise dos resultados obtidos por grupos etários, verificou-se uma seroprevalência de 6,25% no grupo de animais mais jovens, grupo I, de 2,78% no grupo II, e de 7,14% no grupo III (Figura III-VII). No entanto, pela aplicação do teste do qui quadrado, constatou-se que estas diferenças entre grupos etários não é estatisticamente significativa [χ^2 (2, N= 190) = 1,482, $p > 0,05$].

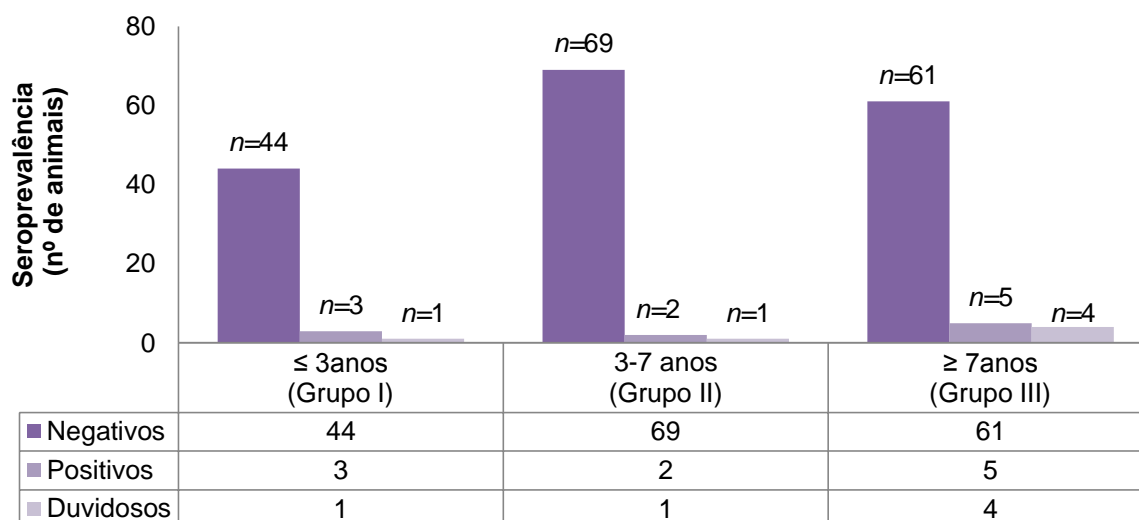


Figura III-VII - Seroprevalência de *Leishmania* spp. por grupo de faixa etária na população canina doméstica em estudo. Consideraram-se positivos os animais com título superior ou igual a 1:100

As dez amostras positivas foram obtidas de nove machos e uma fêmea, sendo a prevalência por sexo de 6,29% e de 2,13%, respetivamente (diferença estatisticamente não significativa [χ^2 (1, N=190) = 1,231, $p > 0,05$]).

Em relação à análise por raças verificou-se uma taxa de seroprevalência de 6,98% na raça cão de Pastor Alemão, 7,14% na raça Pastor Belga, e 4,69% em Retriever do Labrador, não se tendo identificado qualquer outro soro positivo proveniente de animais das outras raças amostradas (Figura III-VIII). As diferenças de prevalência entre as diferentes raças não é estatisticamente significativa [χ^2 (4, N= 190) = 2,093, $p > 0,05$].

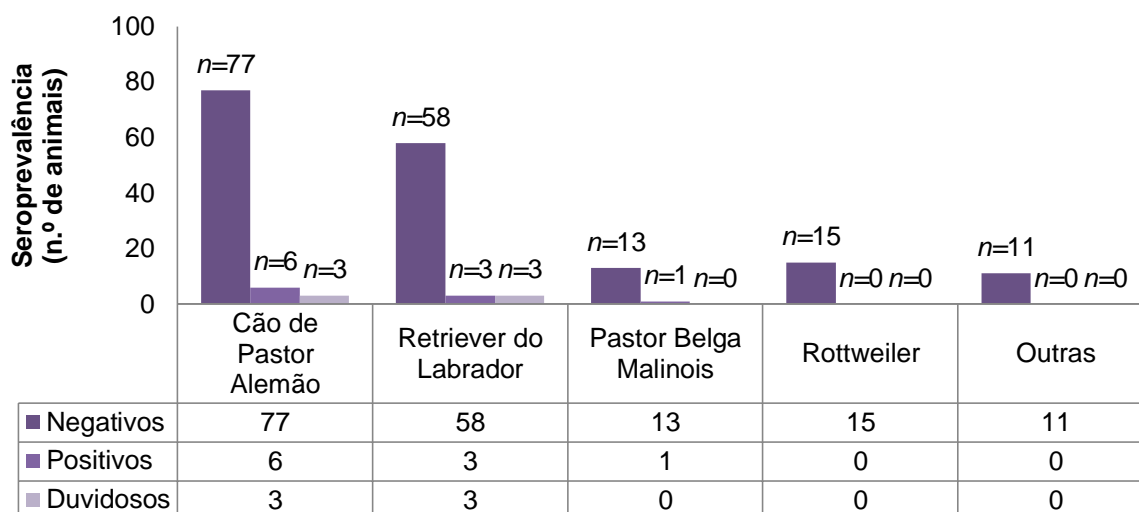


Figura III-VIII - Seroprevalência de *Leishmania* spp. por raça na população canina amostrada (título \geq 1:100)

No que respeita à distribuição geográfica dos animais seropositivos verificou-se que os distritos de Guarda e Castelo Branco apresentaram um animal seropositivo, os distritos de Portalegre e Évora

dois seropositivos, e o distrito de Lisboa quatro animais seropositivos (Figura III-IX). A seroprevalência no distrito de Lisboa foi de 4,76% (Tabela III.7). Por análise estatística, verificou-se que a diferença de seroprevalência encontrada entre o somatório dos distritos do interior (Portalegre, Évora, Castelo Branco e Guarda) e o distrito do litoral (Lisboa) é estatisticamente significativa [$\chi^2(1, N= 84) = 8,169, p < 0,05$]. De igual modo, obteve-se também uma diferença estatisticamente significativa entre a seroprevalência da NUTS de Lisboa e Vale do Tejo (4,49) e a NUTS do Alentejo (19,05) [$\chi^2(1, N= 110) = 4,41, p < 0,05$] (Tabela III.8).

Tabela III.7 – Seroprevalência de *Leishmania* spp. na população canina amostrada por distrito.

Distrito	Total	Seropositivos	Seroprevalentes (%)
Portalegre	4	2	(50)
Évora	6	2	(33)
Castelo Branco	6	1	(17)
Guarda	8	1	(13)
Lisboa	84	4	4,76

Tabela III.8 - Seroprevalência de *Leishmania* spp. na população canina amostrada por Unidade Territorial Estatística.

Unidade Territorial Estatística (NUTS)	Número de cães amostrados	Número de cães seropositivos	Seroprevalentes (%)
Norte	28	0	0
Centro	38	2	5,26
Lisboa e Vale do Tejo	89	4	4,49
Alentejo	21	4	19,05
Algarve	14	0	0
Totais	190	10	5,26

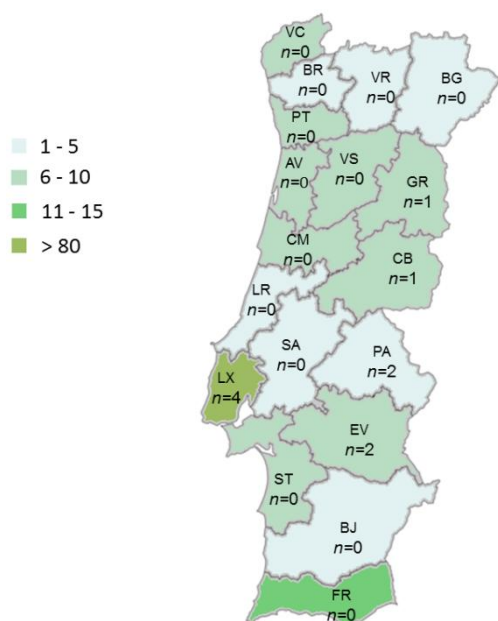


Figura III-IX - Distribuição geográfica e número de cães seropositivos a *Leishmania* spp. O número de indivíduos amostrados por distrito de Portugal Continental encontra-se representado a cores, de acordo com a escala indicada. Abreviações: Viana do Castelo (VC), Braga (BR), Vila Real (VR), Bragança (BG), Porto (PT), Aveiro (AV) Viseu (VS), Guarda (GR), Coimbra (CM), Castelo Branco (CB), Leiria (LR), Santarém (SA), Portalegre (PA), Lisboa (Lx), Setúbal (ST), Évora (EV), Beja (BJ) e Faro (FR)

2.2. Exame clínico e citologia medular

Todos os animais do efetivo cinotécnico da GNR cujo resultado da IFI foi positivo ($n=10$) ou duvidoso ($n=6$), e ainda, aqueles que se encontravam em tratamento para a leishmaniose, apesar do resultado de IFI ser negativo ($n=3$), foram submetidos a exame clínico e a punção aspirativa de medula óssea, para observação citológica por microscopia óptica. Dos animais observados por exame clínico, quinze apresentavam-se em bom estado geral e assintomático; dois apresentavam um quadro clínico de insuficiência renal aguda, um apresentava seborreia seca e outro tinha má condição corporal (Tabela III.9). A avaliação citológica da punção aspirativa de medula óssea (Figura III-X) daqueles 19 animais permitiu identificar três amostras positivas (2, 167, 190) que correspondiam a animais com sinais clínicos.

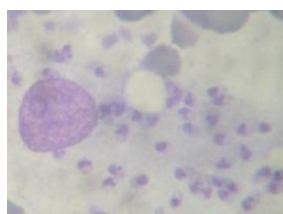


Figura III-X – Presença de *Leishmania* spp. na forma amastigota em citologia de medula óssea (amostra n.º 2, ampliação 400x, coloração Hemacolor® Merck, Nikon eclipse 50i)

Tabela III.9 - Resumo dos resultados obtidos pelo exame clínico e citologia medular nos cães rastreados por IFI com resultado positivo e duvidoso ou negativo mas em tratamento para a leishmaniose.

Amostra	IFI - 1/100	Sintomatologia	Citologia medular
2	Positivo	Má condição corporal	Positiva
3	Positivo	Assintomático	Negativa
7	Positivo	Assintomático	Negativa
10	Positivo	Assintomático	Negativa
24	Positivo	Assintomático	Negativa
103*	Positivo	Assintomático	Negativa
107	Positivo	Assintomático	Negativa
125	Positivo	Assintomático	Negativa
167	Positivo	Seborreia	Positiva
190*	Positivo	Insuficiência Renal Aguda	Positiva
1	Duvidoso (Fluorescência basal)	Insuficiência Renal Aguda	Negativa
44	Duvidoso (Fluorescência basal)	Assintomático	Negativa
78	Duvidoso (Fluorescência basal)	Assintomático	Negativa
108	Duvidoso	Assintomático	Negativa
116	Duvidoso	Assintomático	Negativa
131	Duvidoso (Fluorescência basal)	Assintomático	Negativa
69*	Negativo	Assintomático	Negativa
85*	Negativo	Assintomático	Negativa
139*	Negativo	Assintomático	Negativa

*Animais com diagnóstico de leishmaniose prévio ao presente estudo e em tratamento de manutenção.

Os animais n.ºs 44, 78 e 131 que apresentaram fluorescência basal inespecífica na IFI nos títulos 1:50 e 1:100 e que não apresentaram qualquer sinal clínico sugestivo de leishmaniose, nem exame citológico positivo, não foram incluídos em estudos posteriores. Os restantes animais duvidosos na IFI, que apresentaram uma fluorescência positiva na titulação 1:50 e uma fluorescência inferior ao controlo positivo, mas, ainda assim, superior ao controlo negativo na titulação 1:100 (amostra n.º 108 e 116), ou que apresentaram uma fluorescência basal inespecífica em ambas as titulações mas com sinais clínicos compatíveis com leishmaniose (amostra n.º1), foram, de seguida, conjuntamente com os restantes animais constantes da Tabela III.9, rastreados por métodos moleculares para a presença de *Leishmania* spp., a partir de amostras de medula óssea.

2.3. Rastreio baseado em métodos moleculares

2.3.1. Amplificação de um fragmento do gene da β -actina de mamíferos por PCR

As amostras de ADN extraídas do baço dos mesocarnívoros silvestres ($n=136$) e as amostras de ADN provenientes da medula óssea dos cães, selecionadas com base nos resultados de IFI ($n=16$), foram inicialmente testadas para a presença de inibidores da reação da polimerase em cadeia (PCR). Para o efeito, procedeu-se à tentativa de amplificação por PCR de um fragmento do gene que codifica para a proteína β -actina e que é abundante nas células de mamíferos, de acordo com o descrito em (Ferreira *et al*, 2010). Das 152 amostras de ADN (150 ng) testadas, obtiveram-se quatro negativas e 148 positivas (Tabela III.10), no entanto, para algumas amostras (14 pertencentes aos mesocarnívoros silvestres e seis à população canina), apenas se obteve amplificação do fragmento com a dimensão esperada (aproximadamente 289 pb) quando se reduziu a quantidade de ADN (100 ng), o que sugere a presença de inibidores da reação de PCR para quantidades mais elevadas de ADN. No entanto, para quatro das amostras não se obteve amplificação em qualquer das condições testadas, possivelmente devido à ineficiência do processo de extração de ácidos nucleicos, e foram, portanto, excluídas de estudos posteriores.

Tabela III.10 - Amostras de mesocarnívoros testadas para a amplificação do gene codificante da β -actina por PCR (quantidade inicial de ADN, 150 ng)

Amplificação de um fragmento do gene da β -actina	Mesocarnívoros	
	Silvestres	Domésticos
Positivos	132 [*]	16 [†]
Negativos	4	0

* 14 amostras positivas apenas com 100 ng de ADN

† 6 amostras positivas apenas com 100 ng de ADN

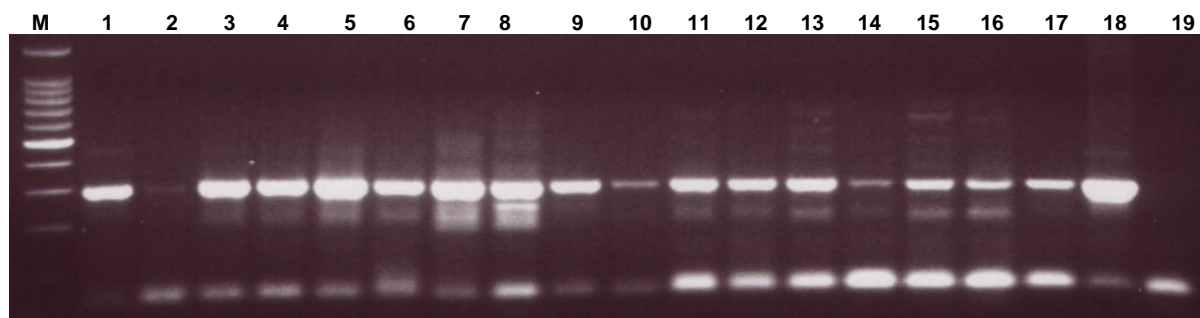


Figura III-XI – Exemplo de separação eletroforética em gel de agarose 1% (m/v) da reação de amplificação por PCR de um fragmento do gene da β -actina, com um tamanho de aproximadamente 289 pb. Pistas: padrão de massas moleculares: hyperladder IV (M), amostras (1-16), controlo positivo (17), controlo negativo (18).

2.3.2. Amplificação de um fragmento de ADN cinetoplastideal de *Leishmania* spp. por PCR

Apesar de se terem testado várias condições de reação das 16 amostras de ADN extraídas de medula óssea, selecionadas de animais da população canina doméstica cujo rastreio serológico foi positivo ou duvidoso e de animais em tratamento, obteve-se a amplificação por PCR de um fragmento de ADN cinetoplastideal de *Leishmania* spp. em apenas quatro (amostras n.º 2, 24, 103 e 190) (Figura III-XII). Todas as amostras positivas por esta técnica tinham também sido positivas pela técnica de IFI.



Figura III-XII - Exemplo de separação eletroforética em gel de agarose 1% (m/v) da reação de amplificação por PCR de um fragmento de ADN cinetoplastideal, com um tamanho de aproximadamente 447 pb. Pistas: padrão de massas moleculares, Hyperladder IV (M), amostras (2-17), controlo negativo (19) e controlo positivo (20).

Em relação aos mesocarnívoros silvestres, das 132 amostras de ADN extraídas de baço, obteve-se a amplificação fraca de um fragmento com a dimensão esperada (aproximadamente 447 pb) em cinco amostras (B95, B99, B101, B102 e B103) (Figura III-XIII). No entanto, este resultado nem sempre foi reproduzível, apesar de se manterem as mesmas condições de amplificação, o que inviabilizou a aplicação posterior da metodologia de RFLP, por não se ter obtido o fragmento pretendido em quantidade suficiente para depois ser submetido a várias reações de restrição com diferentes endonucleases. Para a amostra B95, obtida de um sacarrabos, para além do fragmento esperado,

obteve-se ainda a amplificação de um fragmento adicional com cerca de 840 pb. A fim de uma caracterização mais detalhada, ambos os fragmentos obtidos foram purificados e enviados para sequenciação.

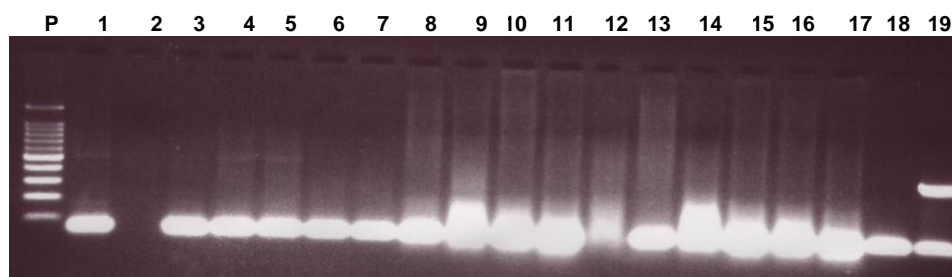


Figura III-XIII - Separação eletroforética em gel de agarose 1% (m/v) da reação de amplificação por PCR de um fragmento de ADN cinetoplastideal, com um tamanho de aproximadamente 447 pb a partir do ADN de baço de mesocarnívoros silvestres. Padrão de massas moleculares: hyperladder IV (pista P); amostras (pistas 1-18) e controlo positivo (19).

2.3.3. Amplificação da região espaçadora intergénica (ITS-1) por PCR

As amostras da população canina que foram rastreadas para a presença de *Leishmania* spp. pela tentativa de amplificação de um fragmento de ADN cinetoplastideal foram, complementarmente, rastreadas por PCR para a primeira região espaçadora intergénica (ITS-1). Das 16 amostras analisadas, verificou-se a amplificação do fragmento esperado, com um tamanho aproximado de 350 pb, em cinco amostras (2, 24, 103, 167 e 190). Com base neste alvo molecular, foi possível identificar-se adicionalmente uma amostra positiva (n.º167) entre os cães de trabalho, por comparação com aquelas que tinham sido identificadas pela amplificação da região hipervariável do ADN cinetoplastideal (Figura III-XIV). No entanto, verificou-se que o sinal de amplificação obtido era de muito menor intensidade do que o obtido na amplificação do ADN cinetoplastideal.

Assim, atendendo a limitações de recursos e, sobretudo, a que os produtos de amplificação do ADN cinetoplastideal obtidos a partir das amostras dos mesocarnívoros silvestres se assemelhavam a artefactos, sendo pouco reprodutíveis e de fraca intensidade, optou-se por não rastrear as amostras dos mesocarnívoros silvestres com base na amplificação da região espaçadora intergénica por PCR convencional.

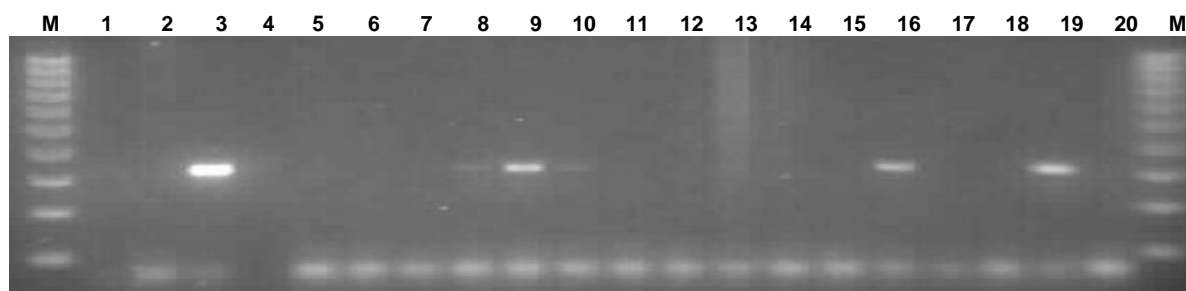


Figura III-XIV - Separação eletroforética em gel de agarose 1% (m/v) da reação de PCR para amplificação da região espaçadora intergénica (ITS-1), com um tamanho de aproximadamente 350 pb. Legenda: padrão de massas moleculares, Hyperladder IV (M), amostras (2-17), controlo positivo (19) e controlo negativo (20).

2.3.4. Amplificação da região espaçadora intergênica (ITS-1) por PCR em tempo real

A amplificação da região espaçadora intergênica (ITS-1) foi ainda testada por PCR em tempo real usando o corante intercalante *EvaGreen®*, nas 16 amostras de medula óssea da população canina selecionada por IFI, na expectativa de se obter maior sensibilidade face à obtida por recurso ao PCR convencional. Os oligonucleótidos usados foram os originalmente adaptados para a detecção do agente por PCR convencional. Para adaptação à técnica de PCR em tempo real (utilizando *EvaGreen®*), as suas concentrações na mistura de reação foram reduzidas com vista à minimização da formação de dímeros, que de outra forma dificultariam a distinção entre resultados positivos e negativos, sobretudo em amostras com pouca quantidade de ADN.

Das amostras testadas, obtiveram-se nove positivas (2, 24, 85, 103¹, 107, 116, 139, 167 e 190¹), e três amplificações inespecíficas (10, 69¹, 125), nas quais se formaram vários fragmentos de tamanhos diferentes ao esperado e que foram confirmados por separação eletroforética em gel de agarose de 1% (m/v). As amostras que apresentaram um Ct maior que 40, e cujo produto de amplificação não era visível após separação eletroforética em gel de agarose, foram consideradas negativas. O Ct médio das amostras positivas foi de 33,30 ($\sigma= 3,24$), enquanto que o Ct médio do controlo positivo foi de 27,80 (Tabela III.11 e Figura III-XV). O valor de Ct médio das amostras correspondentes aos animais sintomáticos foi de 30,82 ($\sigma= 0,82$) e o valor de Ct médio das amostras positivas excluindo os animais sintomáticos foi de 34,54 ($\sigma= 3,32$) (Figura III-XV). Estes resultados são concordantes com a noção empírica de que os animais sintomáticos têm maior carga parasitária do que os animais assintomáticos, uma vez que quanto menor o valor de Ct maior a quantidade de ADN e provavelmente uma maior carga parasitária.

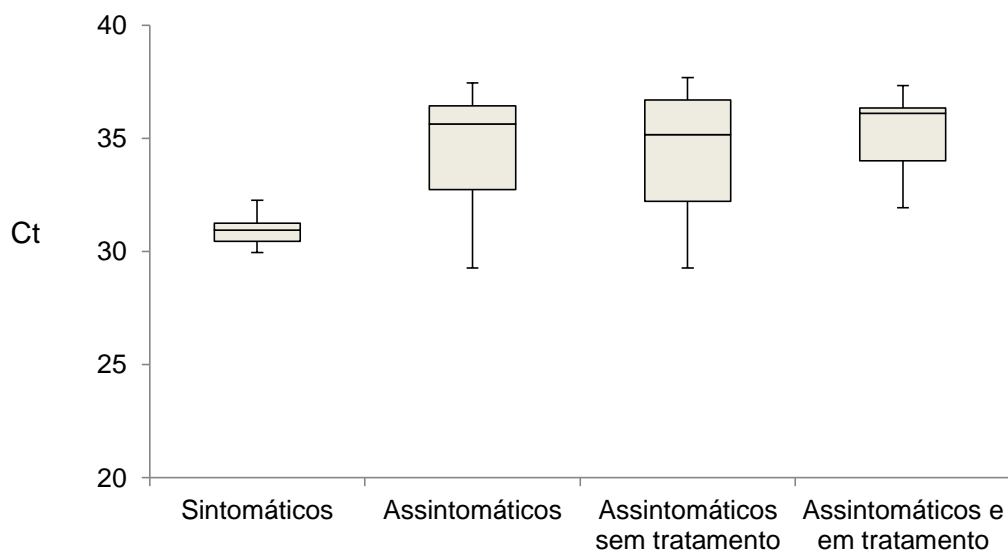


Figura III-XV - Valores de Ct obtidos na amplificação de ADN de *Leishmania* spp. por PCR em tempo real na população canina. Os valores encontram-se agrupados de acordo com a apresentação clínica dos animais, em sintomáticos ou assintomáticos. A população assintomática está subdividida em sem e com tratamento.

De igual modo, os animais em tratamento e assintomáticos nos quais se detectou a presença de ADN de *Leishmania* spp. apresentaram um valor de Ct médio de 34,86 ($\sigma=3,32$), próximo do valor de Ct médio obtido para os restantes animais assintomáticos, de 34,21 ($\sigma=4,56$) (Figura III-XV). Estes valores são sugestivos de uma menor carga parasitária em ambos os grupos, o que poderá significar que a terapêutica de manutenção instituída é eficaz.

Tabela III.11 – Valores de Ct e da temperatura de dissociação das amostras positivas nas quais se obteve amplificação da região ITS-1 por PCR em tempo real.

Número da amostra	Ct	Temperatura de dissociação
2 ²	31,58	81,5
24	29,26	82
85 ¹	36,54	80,5
103 ¹	31,92	81,5
107	35,15	81
116	38,23	81
139 ¹	36,11	81
167 ²	30,93	82
190 ¹²	29,96	81,5
Controlo positivo	27,80	82

Amostras negativas – Ct > 40; Ct médio das amostras = 33,30, desvio padrão = 3,24; Temperatura de dissociação média = 81,33 °C, desvio padrão = 0,5°C

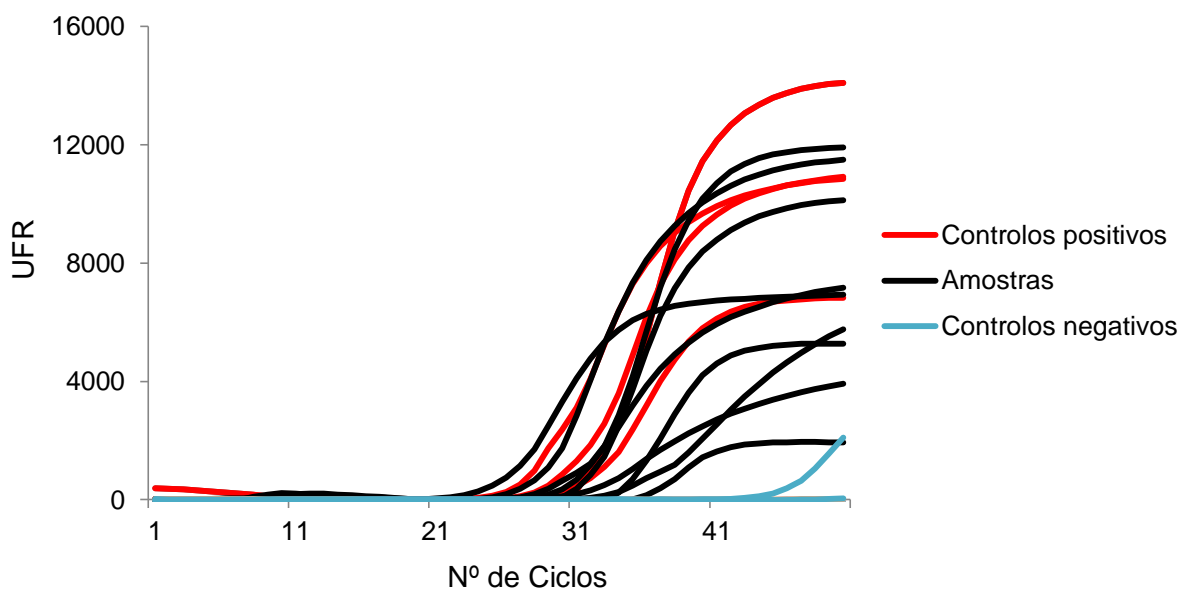


Figura III-XVI - Curvas representativas da amplificação da região espaçadora intergénica ITS-1 obtidas por PCR em tempo real em amostras seleccionadas da população canina doméstica. RFU – Unidades de fluorescência relativa.

¹ Animal em tratamento de manutenção com leishmanioestático, infeção prévia ao estudo.

² Animal sintomático

O valor da temperatura de dissociação média das amostras foi de 81,33°C ($\sigma=0,5^{\circ}\text{C}$), enquanto que o controlo positivo apresentou um valor médio de 82°C. A reação de amplificação da amostra n.º 85 originou dois picos com temperaturas de dissociação de 80,5°C (pico de maior intensidade) e de 85°C (Figura III-XVII e Tabela III.11). Este segundo pico, de menor intensidade, apresenta uma temperatura de dissociação muito diferente do valor de referência do controlo positivo, o que se poderá dever a uma amplificação inespecífica (que não foi detetada em gel), a polimorfismos da sequência amplificada na amostra ou a um artefato na leitura pelo equipamento. O único fragmento visível em gel foi posteriormente sequenciado.

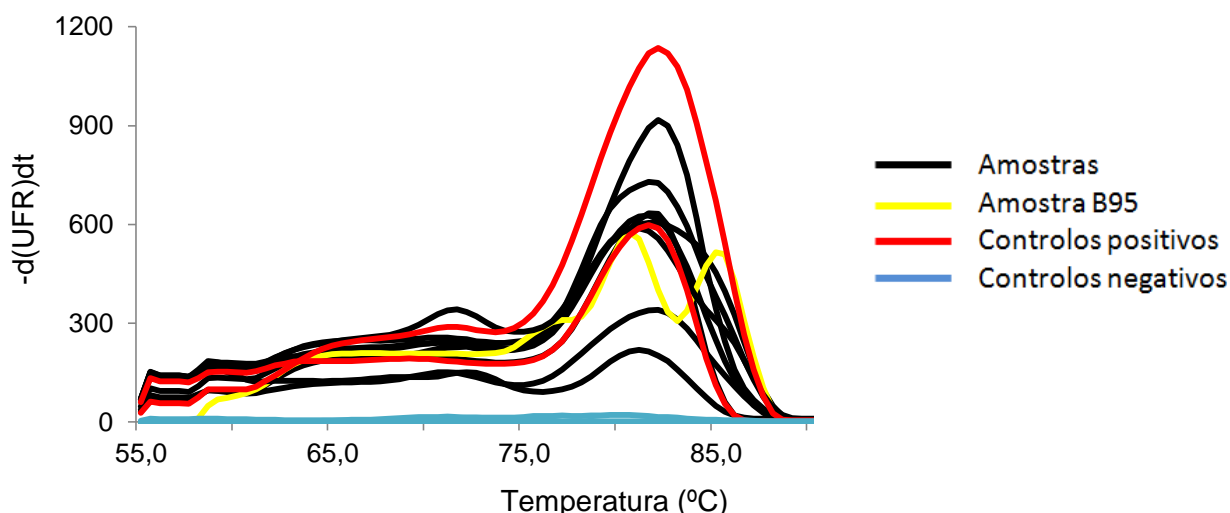


Figura III-XVII - Curvas de temperatura de dissociação obtidas pela amplificação por PCR em tempo real da região espaçadora intergénica ITS-1 de amostras selecionadas da população canina doméstica

A amplificação da região espaçadora intergénica (ITS-1) foi ainda testada por PCR em tempo real nas cinco amostras de mesocarnívoros silvestres que tinham sido positivas para a presença de um fragmento de ADN cinetoplastideal por PCR convencional. Dessas, apenas se obteve amplificação na amostra B95, tendo-se registado um valor de Ct elevado (38,09) e dois picos na curva de dissociação, um a 82°C e outro a 89°C. A visualização do produto de PCR resultante, após separação eletroforética, permitiu constatar que esses valores correspondiam à amplificação de dois fragmentos de tamanho distinto. Ambos os fragmentos foram enviados para sequenciação. No controlo positivo, registou-se um valor de Ct de 29,96 e uma temperatura de dissociação de 82°C.

2.4. Análise integrada dos resultados obtidos pelos diferentes métodos de diagnóstico.

A Figura III-XVIII e a Tabela III.12 resumem os resultados obtidos pelos diferentes métodos de deteção de *Leishmania* spp. utilizados no rastreio da população canina selecionada. Dos dez animais positivos por IFI (título 1:100), três apresentavam sinais clínicos compatíveis com leishmaniose. As amostras de medula provenientes de dois (n.ºs 2 e 190) destes três indivíduos foram positivas para a presença de *Leishmania* spp. em todos os exames complementares de diagnóstico (citologia,

amplificação do ADN cinetoplastideal por PCR convencional e amplificação da região espaçadora intergénica ITS-1 por PCR convencional e por PCR em tempo real). A amostra de medula proveniente do animal nº 167, o qual também apresentava sintomatologia, foi positiva para a presença de *Leishmania* spp. nas várias provas, não se tendo, no entanto, registado a amplificação de ADN cinetoplastideal. Nas restantes sete amostras (animais assintomáticos), duas (nºs 24 e 103) foram positivas pelos três métodos moleculares utilizados; numa (nº 107) apenas se detectou a presença de ADN de *Leishmania* spp. pela amplificação da região espaçadora intergénica ITS-1 por PCR em tempo real; nas restantes quatro amostras, positivas por IFI, não foi possível detectar o ADN de *Leishmania* por qualquer dos métodos e alvos moleculares testados.

Em relação às seis amostras classificadas como duvidosas ou negativas por IFI, três delas foram positivas para a presença de *Leishmania* spp. através da amplificação da região espaçadora intergénica ITS-1 por PCR em tempo real, tendo sido negativas nas demais provas efetuadas (Tabela III.12).

No que respeita aos animais que se sabia previamente estarem doentes e em tratamento de seguimento, os resultados obtidos por IFI foram concordantes com os resultados positivos obtidos pelos métodos moleculares; no entanto, em duas das três amostras provenientes de animais com resultado negativo por IFI, foi possível amplificar, por PCR em tempo real, a região espaçadora intergénica ITS-1

Assim, a amplificação da região ITS-1 por PCR em tempo real foi a abordagem mais sensível para a deteção de ADN de *Leishmania* spp. nas amostras seleccionadas por IFI (Figura III-XVIII).

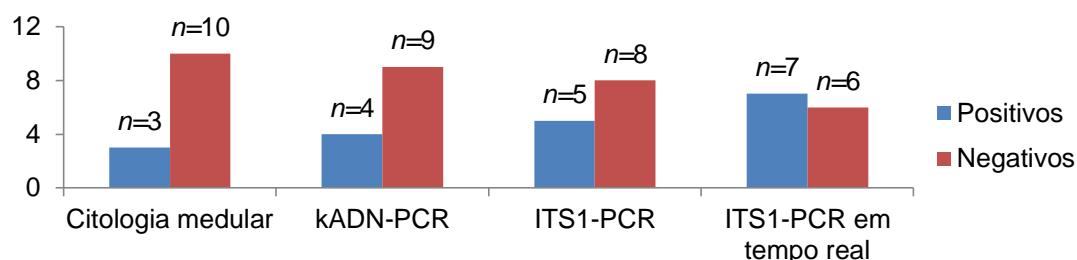


Figura III-XVIII - Resultado dos exames complementares de diagnóstico na população canina doméstica que foi positiva ou duvidosa para *Leishmania* spp. à IFI

No que se refere aos mesocarnívoros silvestres, das cinco amostras nas quais se obteve amplificação do ADN cinetoplastideal de *Leishmania* spp., apenas se conseguiu amplificar a região intergénica ITS-1 por PCR em tempo real na amostra B95. Tendo em conta que as restantes quatro amostras tiveram uma positividade nem sempre reproduzível na amplificação do ADN cinetoplastideal, e que o seu processamento laboratorial foi feito em simultâneo com a amostra B95, é pois, muito provável, que tenha ocorrido contaminação no momento da preparação da reação de amplificação do ADN cinetoplastideal, sendo então consideradas negativas. A amostra que foi positiva pelos dois métodos moleculares apresentou para além da amplificação da região alvo, a amplificação de outra região com cerca de 840 pb, em ambos os métodos.

Tabela III.12 - Resumo dos resultados obtidos pelas diferentes metodologias aplicadas no diagnóstico de *Leishmania* spp. na população canina em estudo

Amostra	IFI	Exame clínico	Citologia medular	kADN-PCR	ITS-1-PCR	ITS-1-RT
2	+	MCC	+	+	+	+
3	+	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-
10	+	-	-	-	-	-
24	+	-	-	+	+	+
103 ¹	+	-	-	+	+	+
107	+	-	-	-	-	+
125	+	-	-	-	-	-
167	+	Seborreia	+	-	+	+
190 ¹	+	IRA	+	+	+	+
1	Duvidoso (FB)	IRA	-	-	-	-
108	Duvidoso	-	-	-	-	-
116	Duvidoso	-	-	-	-	+
69 ¹	-	-	-	-	-	-
85 ¹	-	-	-	-	-	+
139 ¹	-	-	-	-	-	+

IFI – Imunofluorescência indireta; kADN-PCR - Amplificação de um fragmento de ADN cinetoplastideal por PCR convencional, ITS-1-PCR - Amplificação da região espaçadora intergênica 1 por PCR convencional, ITS-1-RT - Amplificação da região espaçadora intergênica (ITS-1) por PCR em tempo real, MCC – Má Condição Corporal, FB – Fluorescência Basal, IRA – Insuficiência Renal Aguda

3. Genotipagem dos isolados de *Leishmania* spp. por métodos moleculares

3.1. Genotipagem por análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição dos produtos amplificados (RFLP)

A variabilidade genética dos produtos obtidos, por amplificação do ADN cinetoplastideal das amostras da população canina (2, 24, 103, 190) e do controlo positivo, foi caracterizada por recurso à análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP), gerados com diferentes endonucleases: *RsaI*, *HpaII*, *PstI*, *DdeI* e *BglII*, de acordo com (Cortes, 2008). As endonucleases selecionadas hidrolisam a sequência em estudo em fragmentos de dimensões variadas. A restrição dos produtos de PCR com as diferentes enzimas originou entre um a três fragmentos com dimensões compreendidas entre 28 e 419 pb, incluindo os fragmentos de tamanho inferior a 40 pb que foram estimados tendo em conta o

¹ Animal com leishmaniose e em tratamento.

tamanho inicial do amplificado e o descrito em (Cortes, 2008). Obtiveram-se padrões de restrição polimórficos com as endonucleases *Ddel* e *BglII*, enquanto que com as restantes endonucleases se obtiveram perfis monomórficos (Figura III-XIX e Tabela III.13).

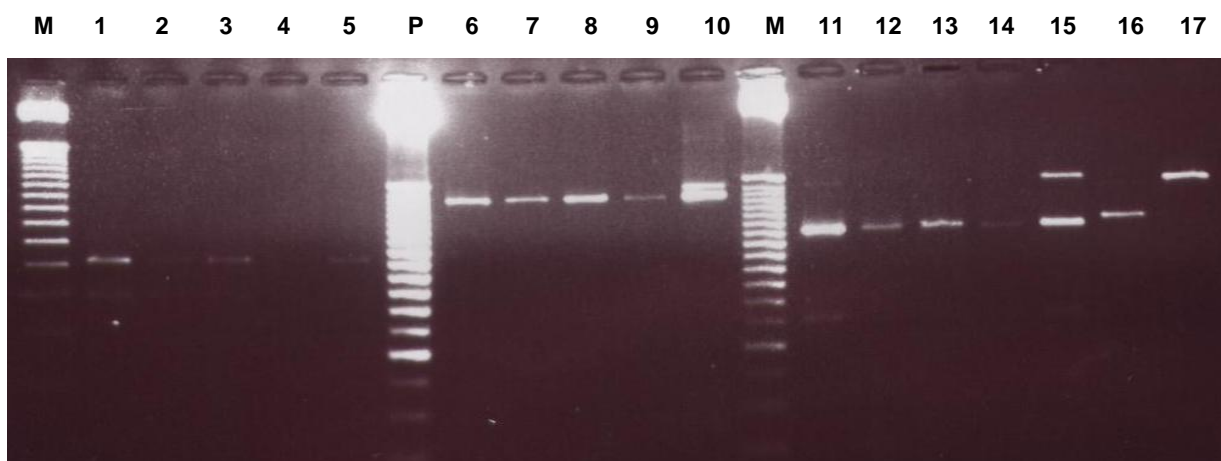


Figura III-XIX - Padrão de restrição de produtos de amplificação do ADN cinetoplastideal obtido com três endonucleases: *RsaI* (1-5), *HpaII* (6-10), *PstI* (11-15), *Ddel* (16), *BglII* (17); padrão de massa molecular, 50 pb (M); padrão de massa molecular, 25 pb (P).

Tabela III.13 - Padrões originados pelos fragmentos de restrição obtidos com cada endonuclease no amplificado de ADN cinetoplastideal

Endonucleases	<i>Ddel</i>		<i>BglII</i>		<i>RsaI</i>	<i>HpaII</i>	<i>PstI</i>
Padrões	I	II	I	II	I	I	I
	419	319	447	258	253	410	289
Fragmentos (pb)	28*	100		189	194	37*	149
		28*					

* Fragmentos de tamanho estimado de acordo com o tamanho inicial do amplificado, a migração electroforética em gel e do descrito em (Cortes, 2008).

A análise dos fragmentos de restrição do ADN cinetoplastideal permitiu definir dois perfis de restrição ou genótipos. O perfil A, identificado em três amostras (2, 24 e 190), e o perfil B, identificado em duas amostras (103 e controlo positivo) (Tabela III.14).

Tabela III.14 - Perfis de restrição obtidos com cada endonuclease no amplicão de ADN cinetoplastideal. Amostras 2, 24, 103, 190 e controlo positivo.

Perfis/genótipos (nº de isolados)	Padrões de restrição originados pelas endonucleases				
	<i>Ddel</i>	<i>BglII</i>	<i>RsaI</i>	<i>HpaII</i>	<i>PstI</i>
A (n=3)	II	II	I	I	I
B (n=2)	I	I	I	I	I

A variabilidade genética dos produtos obtidos por amplificação da região intergénica espaçadora, das amostras da população canina (nºs 2, 4, 85, 103, 107, 116 139, 167, 190) e do controlo positivo, foi

caracterizada por recurso à análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP) gerados com a endonuclease *HaeIII*. Obteve-se um padrão monomórfico com três fragmentos, de massas moleculares compreendidas entre 60 e 200 pares de bases (Tabela III.15).

Tabela III.15 - Genótipo e padrão de restrição originado pela ação da endonuclease *HaeIII* sobre os produtos amplificados correspondentes à região espaçadora intergênica para as amostras examinadas neste estudo, n.ºs. 2, 4, 85, 103, 107, 116, 139, 167, 190 e controlo positivo.

Perfi/genótipo	Padrão de restrição originado pela endonuclease <i>Hae III</i>
A (n=10)	I (Fragmentos de 200, 80 e 60 pb)

3.2. Análise das sequências nucleotídicas dos produtos amplificados correspondentes a um fragmento de ADN cinetoplastideal

Os produtos obtidos da reação de amplificação de um fragmento do ADN cinetoplastideal, das amostras n.ºs. 2, 24, 103, 190, B95 e controlo positivo, foram enviadas para sequenciação numa empresa comercial (StabVida). Para as reações de sequenciação foram utilizadas as mesmas sequências iniciadoras utilizadas na amplificação das cadeias direta e complementar reversa dos fragmentos gerados. As sequências obtidas e respetivos cromatogramas foram depois analisados com recurso aos programas informáticos *FinchTV®* (versão 1.4.0) e *GeneDoc®* versão 2.7.000), para construção das sequências de consenso e alinhamento das mesmas por comparação com sequências depositadas no *Genbank*. A sequência de referência selecionada (JQ609531.1) foi a que apresentou maior homologia com as amostras sequenciadas neste trabalho (consulta do *Genbank* em 15 de Maio de 2013). Esta sequência foi obtida de um isolado de *Leishmania infantum* de um humano em Portugal, no ano de 1996 (Alvarenga *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos do alinhamento das amostras com o isolado de referência são mostrados na Figura III-XX e na Tabela III.16. As sequências obtidas dos cães examinados e a sequência obtida do controlo positivo apresentam uma grande homologia com o isolado de referência. De acordo com os resultados obtidos as amostras n.º2, 24 e 190 da população canina, apresentaram dois polimorfismos evidentes com a amostra n.º103 e o controlo positivo. Estes polimorfismos situam-se aproximadamente na região de 100 pb e 243 pb e são concordantes com os resultados obtidos por RFLP, uma vez que são locais de reconhecimento das endonucleases *DdeI* e *BglII* [(análise das sequências *in silico* com recurso a ferramenta informática *Webcutter 2.0* (disponível em : <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/> em 11 de Junho de 2013)].

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *      100
Amostra2 : ----- : 93
Amostra24 : ----- : 93
Amostra103 : ----- : 92
Amostra190 : ----- : 93
IsoladoLNI : ----- : 95
B095 : ----- : 101
JQ609531.1 : ----- : 82
      ac n  gtgaT  cTCTt t  ATa tgAT t a  AGgTAAGTGCT  TGGACATATGATATAGCCATAGC  GCTTTAGAATAGTTCgACTCCGAAGAC

      *      120      *      140      *      160      *      180      *      200      *
Amostra2 : ----- : 198
Amostra24 : ----- : 198
Amostra103 : ----- : 197
Amostra190 : ----- : 198
IsoladoLNI : ----- : 200
B095 : ----- : 206
JQ609531.1 : ----- : 187
      CCaGTCtG  GGTAAGTAAAGTATACATTAACTAGTATATAATTTAGCATATAATAACTGACATTACTCGTACACTATAAGTATTATGTTTAAATATATTGCTGT

      220      *      240      *      260      *      280      *      300      *
Amostra2 : ----- : 303
Amostra24 : ----- : 303
Amostra103 : ----- : 302
Amostra190 : ----- : 303
IsoladoLNI : ----- : 305
B095 : ----- : 311
JQ609531.1 : ----- : 292
      AGTATGTATTGTGTGCTGTGTAgTAgTaa  ATCTATACCGATATATTTATAGGTGGCGCAtACTGCAGTGAATTGAAAATTAATGAATTGGGGTCGGGCTG

      320      *      340      *      360      *      380      *      400      *      420
Amostra2 : ----- : 407
Amostra24 : ----- : 408
Amostra103 : ----- : 406
Amostra190 : ----- : 407
IsoladoLNI : ----- : 409
B095 : ----- : 415
JQ609531.1 : ----- : 396
      TGGGAAGGTGTCgTAAATTCTGGAAAATGATGGAAAATGGCCAAAATGGGGGG  AAATTCCAAACtTTTCTGGTCCTCCGGGTAGGGGCGTCTGTCAAAATCg

      *      440      *      460
Amostra2 : ----- : 419
Amostra24 : ----- : 421
Amostra103 : ----- : 419
Amostra190 : ----- : 421
IsoladoLNI : ----- : 420
B095 : ----- : 428
JQ609531.1 : ----- : 408
      aAAAA  tGGG  g

```

Figura III-XX - Alinhamento das sequências de consenso obtidas para os fragmentos de ADN cinetoplastideal amplificados a partir de amostras de medula dos cães examinados neste trabalho e comparação com a sequência de referência JQ609531.1

A sequência obtida a partir do menor fragmento da amostra B95 (mesocarnívoro silvestre) apresenta menor homologia com o isolado de referência do que as restantes amostras da população canina (Tabela III.16). Esta situação poderá decorrer do facto de apenas se ter conseguido sequenciar uma das cadeias de ADN do fragmento amplificado, o que inviabilizou a obtenção de uma sequência de consenso *in silico*, que permitiria a eliminação de eventuais erros de sequenciação. Apesar de várias tentativas, não se conseguiu sequenciar o fragmento de maior dimensão da amostra B95.

Tabela III.16 - Parâmetros obtidos do alinhamento das amostras de carnívoros com o isolado de referência JQ609531.1.

Amostra	Tamanho da sequência obtida (pb)*	Identidade (%)	Valor E
2	419	99	0.0
24	421	98	0.0
103	419	99	0.0
190	421	99	0.0
Controlo positivo LNIV	420	99	0.0
B95	428	92	5e-172

* Os vários fragmentos obtiveram sequências de tamanho inferior ao amplificado, uma vez que a sequenciação direta do amplificado não permite obter a sequência das extremidades dos fragmentos

3.3. Análise das sequências nucleotídicas dos produtos amplificados correspondentes a um fragmento da região espaçadora intergénica

Os produtos obtidos da reação de amplificação de um fragmento do ADN da região intergénica das amostras nºs. 2, 24, 85, 103, 107, 116, 139, 167, 190, B95 (e controlo positivo) foram também sequenciados e analisados de forma igual à descrita para o ADN cinetoplastideal. A sequência de referência selecionada (KC347301.1) foi a que apresentou maior homologia com as amostras sequenciadas neste trabalho (consulta do *Genbank* em 15 de Maio de 2013), não se encontrando homologia com nenhum isolado obtido em Portugal. A sequência de referência foi obtida de um isolado de *L. infantum* de um humano no Irão, no ano de 2012 (Bahrami *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos do alinhamento das amostras com o isolado de referência são mostrados na Figura III-XX e na Tabela III.17. As sequências amostradas apresentam homologia entre si, não se identificando polimorfismo. Este resultado é concordante com o obtido por RFLP, que tinha identificado um só perfil para todas as amostras.

		*	120	*	140	*	160	*	180	*	200	*	
Amostra2	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	100
Amostra24	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	100
Amostra85	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	113
Amostra103	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	100
Amostra107	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	113
Amostra139	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	113
Amostra167	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	113
AmostraLNI	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	100
KC347301.1	:	..A...TT.GT.-.T.A.A.....A.AAAA.....G..GT.....G..TATA.....G.AA...T.....T...ACAAAAA...T	:	191									
		GCCaAGTcaTccAtCgCgAcA		C GTtAtgtgA		GCCGttATCcACac		aCGCACCaCCcgcCAAAAaCcgAAAcG		CCGTaTATttttgtATAa			
		220	*	240	*	260	*	280	*	300	*		
Amostra2	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	203
Amostra24	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	203
Amostra85	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	216
Amostra103	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	203
Amostra107	:	.G.....	A.....	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	215
Amostra139	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	216
Amostra167	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	216
AmostraLNI	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	203
KC347301.1	:	...G...CG.T...GCGG..T.....G.GTG.ATA.....CACA.A...TCGCGA.G..TG..TTGG..C...A...TC..T...A	:	287									
		AcGgCaTtTtTtGtataGGcGG		TGCGTtaTaacGtcgAtCGGCctTttttTtAC		TGcaaattTtGagtAcaaaaCTTtgCTgTatGtgGgaAAGg							
		320	*	340	*	360	*	380					
Amostra2	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	240			
Amostra24	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	238			
Amostra85	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	257			
Amostra103	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	243			
Amostra107	:	.C...T..C.-....A.C..T...AA.T..T.....	:	278									
Amostra139	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	257			
Amostra167	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	256			
AmostraLNI	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	244			
KC347301.1	:	A...G..GTA.AG.G....A.....G..ATC.....	:	316									
		cCt aCatatAtaTaC		AtAgGTctccccgagTtgtAta									

Figura III-XXI - Alinhamento das sequências de consenso obtidas para os fragmentos de ADN da região espaçadora intergénica amplificados a partir de amostras de medula dos cães examinados neste trabalho e comparação com a sequência de referência KC347301.1

A amostra 107 apresentou um menor valor de identidade em comparação com as restantes amostras, que se poderá dever ao facto de se ter conseguido sequenciar apenas uma das cadeias do fragmento amplificado, não permitindo obter uma sequência de consenso da referida amostra. Apesar de várias tentativas não foi também possível sequenciar o fragmento de ITS-1, amplificado das amostras B95, 116 e 190.

Tabela III.17 - Parâmetros obtidos do alinhamento das amostras de cães com o isolado de referência KC347301.1

Amostra	Tamanho do fragmento* (pb)	Identidade (%)	Valor E
2	240	100	2e-121
24	238	100	2e-128
85	257	99	1e-135
103	243	100	3e-131
107	278	92	9e-97
139	257	99	1e-135
167	255	99	3e-136
Controlo positivo INIAV	244	99	4e-130

* Os tamanhos dos vários fragmentos sequenciados foram inferiores ao tamanho dos amplicões, uma vez que a sequenciação direta do amplificação, sem clonagem, dificulta a obtenção da sequência das extremidades dos fragmentos.

IV DISCUSSÃO

Em Portugal, a leishmaniose é uma doença parasitária de elevada importância, quer pelo elevado número de cães infetados, quer pelo seu potencial impacto na Saúde Pública. Atualmente, estão descritos em humanos vários casos clínicos de leishmaniose visceral, sendo já, a leishmaniose, a terceira doença mais frequente em coinfeções por HIV (Campino e Maia, 2010). Em relação à leishmaniose canina, a doença está praticamente presente em todo o território continental, havendo, no entanto diferenças de prevalência entre as várias regiões do país (Cortes *et al.*, 2012). As infeções ocorridas têm sido associadas a *L. infantum*, no entanto, o país reúne ainda condições vetoriais e climáticas para a introdução de outras espécies de *Leishmania* existentes no Norte de África, pelo que no futuro poderão aparecer formas clínicas da doença causadas por outras espécies (Afonso, 2011).

Nas últimas décadas o conhecimento sobre a leishmaniose tem evoluído significativamente: no que se refere à identificação de outras vias de transmissão que não a vetorial, na constatação da existência de outros vetores para além do género *Phlebotomus*, na identificação de novos hospedeiros vertebrados e no desenvolvimento de novos exames de diagnóstico, de fármacos profiláticos e terapêuticos. Todos estes aspetos têm contribuído para uma melhor prevenção e controlo da doença. A nível nacional a maior parte dos estudos sobre a leishmaniose animal tem incidido em populações de carnívoros domésticos, particularmente o cão, mas também o gato. No entanto, a elevada diversidade de fauna silvestre (catorze espécies de carnívoros estritamente terrestres) (Loureiro *et al.*, 2013) em diferentes nichos ecológicos, bem como a sinantropia com animais domésticos e a proximidade de populações humanas contribuem para que algumas regiões de Portugal possuam características favoráveis à interação entre agente patogénico, vetores/reservatórios e hospedeiros, permitindo a transmissão e a disseminação da doença entre diferentes espécies. Neste sentido, o presente trabalho procurou contribuir para a elucidação do ciclo de transmissão do parasita *L. infantum* em Portugal, através do rastreio, análise e caracterização molecular das infeções por *Leishmania* spp. em duas populações de carnívoros distintas, uma silvestre e outra doméstica. Para a população doméstica pretendeu-se também determinar possíveis fatores de risco para a incidência da doença, sobretudo no que se refere aos resultados de seroprevalência. Deste modo, investigaram-se eventuais associações estatísticas pelo teste de qui-quadrado entre a deteção do agente etiológico, refletida pela prevalência estimada, e as seguintes variáveis: raça, sexo, idade, e localização geográfica.

A análise da prevalência da doença na população silvestre, examinada no presente trabalho, foi baseada na deteção de ácidos nucleicos de *Leishmania* spp. a partir de uma coleção de tecidos, de várias espécies de mesocarnívoros, reunida no LNIV. Através da tentativa de amplificação de ADN cinetoplastideial de *Leishmania* spp. por PCR convencional foi possível identificar apenas um animal positivo, da espécie *Herpestes ichneumon* (sacarrabos). Este animal, adulto e do sexo feminino, seria possivelmente portador assintomático, já que, durante a necrópsia, não foi possível detetar quaisquer

evidências de doença clínica nem lesões cutâneas ou viscerais. Este espécime foi recolhido no distrito de Beja, num dos distritos com maior seroprevalência de infeção por *Leishmania* spp. no cão (12,12%) (Cortes *et al.*, 2012) e no qual não se obteve positivos entre os cães da GNR. Os resultados da sequenciação do ADN cinetoplastideal permitiram identificar este isolado como *L. infantum*, registando-se uma elevada homologia (92%) entre o amplificado deste exemplar e os isolados de *L. infantum* detetados na população canina da GNR, bem como com isolados cuja sequência se encontra depositada nas bases de dados internacionais.

A deteção de *L. infantum* em sacarrabos no território nacional é assim descrita pela primeira vez neste trabalho, existindo já, no entanto, descrições da presença deste protozoário nesta espécie animal no Sudão, onde foi sugerido que o sacarrabos possa atuar como reservatório (Elnaiem *et al.*, 2001), e em Espanha (Sobrino *et al.*, 2008). Embora só tenha sido identificado um exemplar positivo, o número de animais silvestres portadores ou afetados pela doença poderá estar subestimado, uma vez que a população silvestre analisada advém de atropelamentos e de ações de caça menor, e portanto, de origem antropogénica, não tendo sido analisados espécimes vivos com sintomatologia de leishmaniose ou encontrados naturalmente mortos. Atente-se ainda que o estado de conservação das amostras recolhidas poderá também ter condicionado os resultados obtidos, uma vez que um número elevado de animais analisados (cerca de 70%) encontrava-se em estado moderado ou de considerável autólise, o que poderá ter originado a degradação e subsequente fragmentação do ADN do parasita. Este aspeto, aliado ao tamanho considerável dos alvos moleculares utilizados neste estudo (de 300 a 447 pb), poderá ter dificultado a deteção de fragmentos desta dimensão, resultando possivelmente em falsos negativos na população examinada. A tentativa de deteção de ADN de *Leishmania* spp. foi apenas realizada em baço, uma matriz diferente da utilizada na população canina (medula óssea). Seria portanto interessante em futuros trabalhos explorar outras matrizes nestes animais, tais como o fígado (Srivastava *et al.*, 2013), o que poderá também levar a um aumento de sensibilidade para a deteção molecular. Acresce ainda que sendo *Leishmania* spp. um parasita intracelular, a extração do respetivo ADN é frequentemente dificultada e dependente da carga parasitária, pelo que uma extração de ADN ineficiente também poderá ter contribuído para a dificuldade de deteção de um maior número de animais positivos. Dado os animais terem sido recolhidos horas após a morte, não foi colhido soro, o que inviabilizou a deteção de anticorpos anti-*Leishmania* nesta população, limitando a avaliação complementar de contato destes animais com este agente etiológico. Acresce ainda que devido ao conjugado anti-espécie usado nas metodologias serológicas ser comercial e específico para cães e, tendo em conta que eram várias as espécies silvestres em estudo, apenas seria possível efectuar serologia com alguma confiança em raposas (também um canídeo), ainda que com alguma perda de sensibilidade. A utilização de extrato de pulmão (LTE), que também permite análises serológicas, também não foi explorada neste estudo pelas mesmas razões. A menor sensibilidade da deteção de ADN da região intergénica ribossomal de *Leishmania* spp. por comparação com a deteção de ADN cinetoplastideal, verificada nos cães da GNR, levou a que se limitasse a análise molecular a este último alvo na população silvestre.

Em Portugal os estudos existentes na fauna silvestre são ainda limitados, tendo sido, no entanto, demonstrada a infeção por *L. infantum* em raposas vermelhas (*V. vulpes*) da região da Arrábida,

(Abranches *et al.*, 1984) e (Semião-Santos, 1996), e no lobo (*Canis lupus*), (Sastre *et al.*, 2008) e (Rosa *et al.*, 2013). Um outro estudo registou prevalências de 34-50% em raposas provenientes de várias regiões do país (Pereira da Fonseca *et al.*, 2002) sugerindo que esta espécie silvestre possa ser um potencial reservatório da doença. Estas evidências contrastam com as reunidas nesta dissertação, uma vez que não se detetou *Leishmania* spp. em qualquer das raposas analisadas, à semelhança com o obtido num estudo serológico efetuado recentemente do Parque Nacional da Peneda do Gerês, onde também não se detetou este agente em raposas e lobos daquela região (Ferreira, 2010). Tal facto, poderá ser devido ao reduzido número de amostras de raposas analisadas neste estudo ($n=18$) e à localização geográfica das mesmas.

Em relação à população doméstica, a população estudada e caracterizada para a presença da *Leishmania* spp. pertencia ao efetivo canino da Guarda Nacional Republicana. A escolha desta população permitiu o estudo de uma população canina padronizada, quer do ponto de vista sanitário, quer do ponto de vista utilitário ou funcional, clinicamente caracterizada e vigiada, e com larga distribuição pelo território nacional continental. Este estudo permitiu dar, ainda, um contributo prático no esforço contínuo que, com dedicação e perseverança, a Divisão de Medicina Veterinária da GNR tem vindo a desenvolver no controlo desta doença zoonótica.

A seroprevalência de *Leishmania* spp. detetada na população doméstica estudada foi de 5,26%. Este agente está descrito em várias regiões de Portugal continental, com prevalências que variam entre 0,94-17,40% (Cortes *et al.*, 2012), sendo o valor de seroprevalência obtido no presente estudo semelhante ao descrito para a população canina a nível nacional (6,31%, $N=3974$) (Cortes *et al.*, 2012). Comparando a seroprevalência de *Leishmania* spp a nível nacional em animais que fazem proteção efetiva ao vetor transmissor (5,05%) (Cortes *et al.*, 2012) e a seroprevalência obtida na população doméstica estudada neste trabalho (5,26%), não se regista uma diferença estatisticamente significativa [χ^2 (1, $N=190$) = 0,019, $p > 0,05$]. Apesar do estudo atrás referido ser baseado numa população consideravelmente superior e utilizar um método serológico diferente (teste de aglutinação direta) ao utilizado no presente trabalho, os resultados sugerem que a profilaxia instituída no efetivo canino da GNR tem sido eficaz. Alguns estudos evidenciam que a suscetibilidade e resistência à infeção por *L. infantum* parece ter uma base genética, sugerindo que as raças de cães autóctones de países endémicos sejam mais resistentes do que as raças de cães exóticas ou importadas (Solano-Gallego, 2000). Neste estudo examinaram-se apenas animais de raças exóticas, não se observando diferenças entre elas. De igual modo, também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na prevalência entre machos e fêmeas, à semelhança do descrito por (Cortes *et al.*, 2012), e apesar de alguns estudos descreverem uma prevalência maior nos machos (Miranda, 2008). Apesar de estar descrito que animais mais jovens (menos de 3 anos) e animais mais velhos (mais de 7 anos) são mais suscetíveis à leishmaniose (Miró *et al.*, 2012), neste trabalho as diferenças de seroprevalência nos diferentes grupos etários (grupo I - 6,25%, grupo II - 2,78%, grupo III - 7,14%) não são estatisticamente significativas [χ^2 (2, $N=190$) = 1,482, $p > 0,05$]. Esta discrepância de resultados, entre o presente trabalho e o estudo realizado em Espanha por (Miró *et al.*, 2012) e que

incidiu numa população de cães de canil (N=418), poderá estar relacionada com o facto dos cães da GNR fazerem profilaxia a ectoparasitas, o que de acordo com (Cortes *et al.*, 2012) contribui para diminuição da suscetibilidade da população. Em relação à distribuição geográfica, e apesar dos animais não terem uma localização geográfica fixa ao longo da sua vida, obteve-se uma diferença estatisticamente significativa entre as prevalências observadas no interior do país e no litoral. Este resultado é igualmente concordante com o descrito por (Cortes *et al.*, 2012), que também refere valores de prevalência maiores nos distritos do interior do país [Castelo Branco (17,40), Portalegre (12,54), Beja (12,12), Vila Real (8,38)]. O facto do número de animais seropositivos obtidos neste estudo ser relativamente baixo (n=10, N=190) dificulta uma análise estatística multivariada e mais detalhada da população, evidenciando o tamanho da amostra como fator limitante no tipo de conclusões que podem emergir destes estudos.

Os animais da população doméstica que apresentaram amostras citológicas positivas tinham sinais clínicos compatíveis com a leishmaniose. Em animais sintomáticos é provável que exista uma maior carga parasitária e, conseqüentemente, uma maior probabilidade de se detetar o parasita por citologia medular. Apesar da observação e reconhecimento da *Leishmania* spp. por citologia requerer um observador experiente, este método tem elevada especificidade, é relativamente simples de realizar e de baixo custo, podendo ser facilmente executado num centro de atendimento veterinário que possua microscópio.

Em relação à metodologia molecular utilizada no diagnóstico de *Leishmania* spp. na população canina obtiveram-se quatro amostras positivas por PCR convencional, com base na deteção de ADN cinetoplastideal, e cinco amostras positivas, de sinal mais fraco, com base na região espaçadora intergénica. A diferença detetada na intensidade do sinal obtido poderá-se dever a uma diferente afinidade das sequências iniciadoras para a sua região alvo, ou à existência de diferente número de cópias da região alvo amplificada. Em relação à discrepância do número de amostras positivas entre os dois métodos, esse resultado poderia-se dever ao facto das sequências iniciadoras utilizadas na amplificação da região espaçadora intergénica poderem ser menos específicas ao amplificar regiões de outros tripanossomatídeos não pertencentes ao género *Leishmania*, tal como foi referido em estudos anteriores (Lopes da Silva *et al.*, 2010), no entanto, os resultados obtidos pelo alinhamento e análise das sequências amplificadas da região ITS-1 revelaram uma elevada homologia (92 a 100%) entre todos os isolados obtidos e *Leishmania infantum*, tendo havido inclusive, no exame citológico, o reconhecimento morfológico do agente como *Leishmania* spp. na amostra discordante. Este resultado sugere que o isolado detetado apenas com base na região ITS-1 possa pertencer a um zimodeme cujo ADN cinetoplastideal apresente baixa homologia para as sequências iniciadoras usadas para a amplificação daquela região. Apesar de se ter tentado cultivar em meio NNN a amostra de medula deste animal infetado, para o isolamento de *Leishmania* spp. e posterior caracterização bioquímica e isoenzimática pelas técnicas de referência, nunca se conseguiu obter o isolado *in vitro*, o que se poderá dever ao facto do animal ter entrado logo em tratamento após a deteção da infeção, com a subsequente diminuição da carga parasitária. A amplificação da região espaçadora intergénica (ITS-1) por PCR em tempo real permitiu identificar nove animais positivos. Este método foi o que maior sensibilidade apresentou neste estudo, detetando inclusive, como positivos, alguns animais

seronegativos que estavam em tratamento de manutenção. Estes resultados poderão-se dever ao facto do limiar de positividade escolhido para a técnica de IFI ser igual ou superior a 1:100, o que poderá ter originado alguns falsos negativos. Este aspeto é particularmente importante na primeira fase da (re)infecção, quando a produção de anti-corpos ainda se está a iniciar ou quando o animal não desenvolve uma resposta humoral à (re)infecção, quer seja por resistência inata ou adquirida, quer seja por a carga parasitária presente ser ainda insuficiente. Neste caso concreto os animais em questão estavam em tratamento de manutenção, assintomáticos e estabilizados, e assim permaneceram nos meses posteriores ao estudo, pelo que os resultados são sugestivos de que a medicação de manutenção manteve a carga parasitária em valores baixos, não havendo desenvolvimento da resposta humoral. Os valores de Ct obtidos durante a reação de amplificação são concordantes com as quantidades presumíveis de carga parasitária que cada amostra teria; quanto maior o valor de Ct menor a carga de ADN na amostra, e possivelmente menor a carga parasitária. Os animais sintomáticos apresentam de modo geral um valor de Ct menor e os animais que apenas foram positivos por esta metodologia um valor de Ct maior. Os resultados apresentados sugerem então que esta técnica pode apresentar uma utilização promissora na identificação de portadores/reservatórios, na monitorização da terapêutica e no despiste de seropositivos assintomáticos. O acompanhamento da evolução da quantidade parasitária no hospedeiro, conjugada com o estado clínico do animal, iria permitir ao clínico identificar se o animal em causa é naturalmente imune, suscetível ou se a infeção está de novo ativa.

A análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição (RFLP) da região espaçadora intergénica e do fragmento do cinetoplasto amplificados, a partir de amostras de medula óssea, permitiu a identificação de um e dois perfis de restrição, respetivamente, de *Leishmania infantum* entre a população canina positiva. Dado o número reduzido de amostras positivas, não foi possível estabelecer qualquer correlação entre os dois perfis obtidos por RFLP do ADN cinetoplastideal e a localização geográfica, sexo, idade ou raça dos animais afetados. Os resultados obtidos por RFLP foram concordantes com os resultados obtidos pela análise comparativa e alinhamento das sequências nucleotídicas dos vários produtos amplificados.

O alinhamento das sequências dos fragmentos amplificados do ADN cinetoplastideal revelou uma elevada homologia com um isolado de *L. infantum* depositado no *Genbank* que foi obtido de um humano em Portugal, enquanto que o alinhamento das sequências dos fragmentos amplificados do ADN da região espaçadora intergénica mostraram uma alta homologia com um isolado de *L. infantum* obtido de um humano no Irão. Apesar das sequências registarem uma elevada homologia (92 a 100%), verificaram-se alguns polimorfismos únicos em alguns nucleótidos. A sequência obtida do isolado pertencente à população silvestre apresentou uma homologia menor com o isolado de referência selecionado (92%), por comparação com as sequências dos isolados obtidos a partir da população doméstica (98 a 99%).

O diagnóstico e o tratamento da leishmaniose canina é um desafio clínico, quer pela diversidade de sinais inespecíficos existentes, quer pela presença e coabitação numa mesma população de animais infetados (sintomáticos e assintomáticos) e não infetados. Para além disso, o tratamento, apesar de

ser oneroso e para toda a vida, raramente resulta numa cura parasitológica. Por outro lado, a eficácia dos testes de diagnóstico varia muito com a fase da doença e a carga parasitária, pelo que a utilização de várias metodologias é recomendável (Baneth e Aroch, 2008). A maioria dos cães com leishmaniose visceral desenvolve uma resposta humoral específica, pelo que a serologia é amplamente utilizada no diagnóstico da doença. A sensibilidade das técnicas serológicas é menor (41%) nos primeiros meses de infeção (1,5 a 3 meses), mas aumenta progressivamente com a evolução da doença, atingindo valores entre 93% e 100% (Martinez *et al.*, 2011). Em geral, a técnica de IFI é bastante prática e eficaz na deteção de títulos de anticorpos específicos, contudo, é importante salientar algumas limitações, nomeadamente a ocorrência de reatividade cruzada que pode dar origem a falsos positivos em cães com doença de Chagas, ehrliquiose, riquetsiose, toxoplasmose ou com parasitas *Trypanosoma spp.* (principalmente nas Américas do Sul e Central (Baneth e Aroch, 2008). Adicionalmente, nos testes de IFI, a subjetividade da leitura e interpretação do grau de fluorescência observada podem influenciar os resultados. Dos sete cães seropositivos assintomáticos detetados neste trabalho, quatro foram negativos por métodos moleculares. Este facto poderá significar que há animais assintomáticos que não desenvolveram a doença, mas que têm um título igual ou superior a 100, e que este se mantém durante alguns meses. Esta interpretação é coerente com o descrito por (Nejjar *et al.*, 2000), em que dez animais, assintomáticos e com cultura negativa, apresentaram um título superior ou igual a 1:100, tendo quatro deles seroconvertido em seis meses e os restantes em doze meses. Do ponto de vista clínico, este ponto é de extrema importância, porque o diagnóstico definitivo de leishmaniose baseado somente em IFI, em animais assintomáticos, pode ser sobrestimado. Este aspeto pode inclusive contribuir para a incorreta interpretação do sucesso da terapêutica instituída, quer de ataque quer de manutenção, dificultando a comparação da eficácia dos tratamentos e a aferição de protocolo terapêutico adequado. Desta forma, conciliando e integrando a capacidade de diagnóstico das diferentes metodologias utilizadas neste trabalho e os resultados obtidos, pode-se, de acordo com a bibliografia enunciada, elaborar uma chave de decisão de apoio ao clínico no diagnóstico desta enfermidade (Figura IV-I e Figura IV-II).

Assim, num país endémico como Portugal, o diagnóstico definitivo de leishmaniose num animal sintomático passará obrigatoriamente pela interpretação da intensidade do quadro clínico apresentado e da necessidade, daí resultante, de confirmação laboratorial, idealmente executada pela obtenção de uma citologia medular positiva ou de um título alto na IFI. Num animal assintomático o diagnóstico definitivo de leishmaniose deverá passar pela obtenção de um título alto persistente na IFI, pela obtenção de uma citologia positiva ou pelo aparecimento de sinais compatíveis com leishmaniose [adaptado de: (Solano-Gallego *et al.*, 2011)].

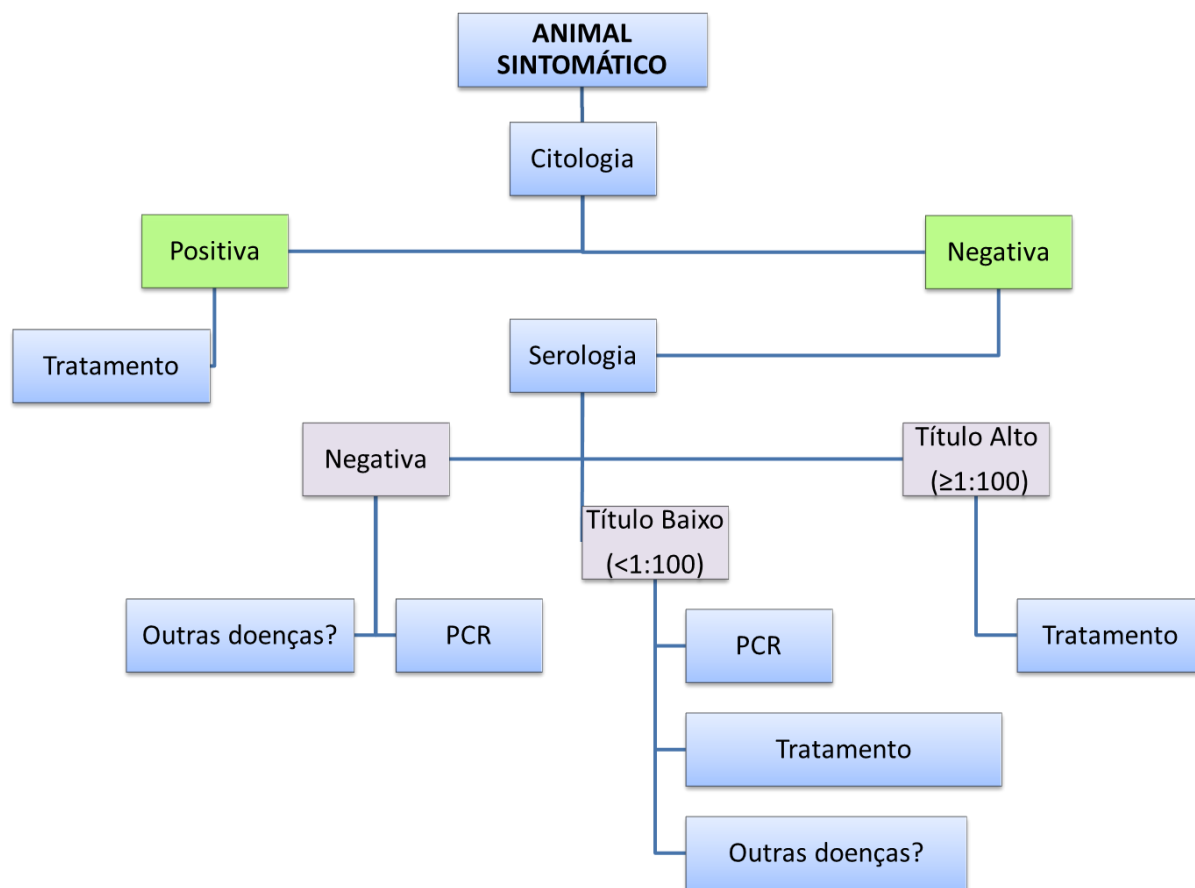


Figura IV-I- Fluxograma de diagnóstico de leishmaniose num cão sintomático [Adaptado de: (Solano-Gallego *et al.*, 2011)]

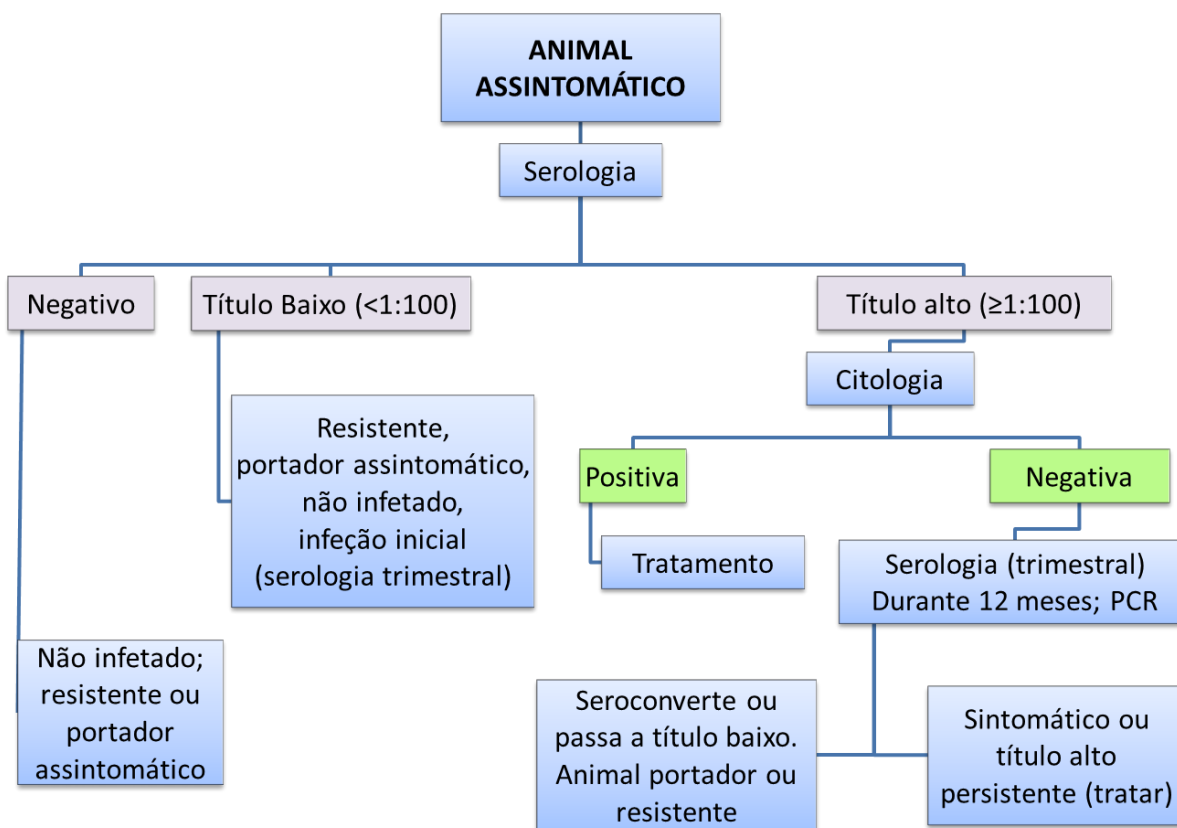


Figura IV-II - Fluxograma de diagnóstico de leishmaniose num cão assintomático num país endémico (Adaptado de : Solano-Gallego *et al.*, 2011)

A realização deste estudo permitiu por um lado rastrear a presença de *Leishmania* spp. numa população silvestre, dando assim o seu contributo no estudo da epidemiologia da leishmaniose no ciclo silvestre e identificando a espécie *Herpestes ichneumon* como possível portadora de *Leishmania infantum* em Portugal. Apesar dos resultados obtidos neste trabalho não sugerirem que as espécies analisadas neste estudo estejam particularmente expostas a este parasita, realça-se a necessidade de se efetuarem mais estudos para avaliar com maior profundidade o papel dos mesocarnívoros silvestres no ciclo epidemiológico da leishmaniose em Portugal, reforçando-se os programas de vigilância já existentes e a sua extensão a todas as áreas do território nacional, particularmente em zonas onde a interação entre animais silvestres, domésticos, vetores e o Homem seja pronunciada. Por outro lado, o estudo da população doméstica permitiu a caracterização detalhada da infeção por *Leishmania* spp. no efetivo da Guarda Nacional Republicana, dando não só o seu contributo para o trabalho contínuo que a Divisão de Medicina Veterinária da GNR desempenha na manutenção de um elevado padrão sanitário no seu efetivo cinotécnico, como também permitindo, através da análise e discussão dos resultados dos exames complementares de diagnóstico realizados, sugerir uma chave de apoio ao diagnóstico clínico.

V BIBLIOGRAFIA

- Abranches, P., Conceição Silva, F.M. e Silva Pereira, M.C. 1984. Kala-azar in Portugal. V. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrabida. The Journal of tropical medicine and hygiene 87: 197-200.
- Afonso, M.O. 2011. O papel dos insectos vectores pertencentes à Subfamília Phlebotominae e Família Glossinidae na transmissão de protozoários Trypanosomatidae: monitorização e controlo. O efeito das alterações climáticas nas populações vectoriais. Boletim Informativo do Grupo de Investigação em Ciência e Tecnologia Animal ICAAM / Universidade de Évora 3: 1-5.
- Akopyants, N.S., Kimblin, N., Secundino, N., Patrick, R., Peters, N., Lawyer, P., Dobson, D.E., Beverley, S.M. e Sacks, D.L. 2009. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. Science 324: 265-268.
- Alonso, D.P. 2011. Utilização de marcadores moleculares no estudo populacional de *Leishmania infantum chagasi* no Brasil. Tese de Doutoramento. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista: 1-5.
- Alvarenga, J.L., Ligeiro C. M., Gontijo, C.M., Cortes, S., Campino, L., Vago, A.R. e Melo, M.N. 2012. KDNA genetic signatures obtained by LSSP-PCR analysis of *Leishmania infantum* isolated from the new and the old world. PLoS one 7.
- Alves, A.S., Mouta-Confort, E., Figueiredo, F.B., Oliveira, R.V., Schubach, A.O. e Madeira, M.F. 2012. Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral *Leishmaniasis* and natural infection by *Trypanosoma caninum*. Research in veterinary science 93: 1329-33.
- Ameen, M. 2010. Cutaneous *Leishmaniasis*: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. Clinical and Experimental Dermatology 35: 699–705.
- Bahrami, A., Maleki Ravasan, N., Rassi, Y., Oshaghi, M.A., Soleimanfallah, M. e Dadashi Eynsheyk, Z. 2012. Study and determination of vectors of visceral and cutaneous *Leishmaniasis*, using molecular methods in Savodjbolagh County, Alborz Province, Iran. Unpublished.
- Baneth, G e Aroch, I. 2008. Canine *Leishmaniasis*: A diagnostic and clinical challenge. The Veterinary Journal 175: 14-15
- Baneth, G. e Shawb, S.E. 2002. Chemotherapy of canine leishmaniosis. Veterinary Parasitology 106: 315–24.
- Bañuls, A. L., Hide, M. e Prugnolle, F., 2007. *Leishmania* and the *Leishmaniases*: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in Humans. Advances in parasitology 64: 1-109
- Bari, A. 2006. Chronology of cutaneous *Leishmaniasis*: An overview of the history of the disease. Journal of Pakistan Association of Dermatologists 16: 24-27.
- Bessad, A., Mouloua, K., Kherrachi, I., Benbetka, S., Benikhlef, R., Mezai, G. e Harrat, Z. 2012. *Leishmania infantum* MON-1 isolated from a golden jackal (*Canis aureus*) in Grande Kabylie (Algeria). Bulletin de la Société de pathologie exotique 105: 5-7.

- Bhargava, P. e Singh, R. 2012. Developments in Diagnosis and Anti-*Leishmanial* Drugs. Interdisciplinary perspectives on infectious diseases 2012: 1-13.
- Borja-Cabrera, G.P., Santos, F.B., Nico, D., Gravino, A.E., Manna, L., Palatnik, M. e Palatnik-de-Sousa, C.B. 2012). The Leishmune®s Nucleoside hydrolase DNA vaccine as an aid in immunotherapy of canine visceral *Leishmaniasis*. Procedia in Vaccinology 6: 64–73.
- Bray, R.S. 1987. Note on the history of cutaneous *Leishmaniasis* in the Mediterranean and Middle East area. Parassitologia 29: 175-9.
- Breuil, R.M., Patel, J.M. e Mendelow, B.V. 1993. Quantitation of beta-actin-specific mRNA transcripts using xeno-competitive PCR. PCR Methods and applications 3: 57-59.
- Campino, L. e Maia, C. 2010. Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. Acta Medica Portuguesa 23: 859-864.
- Campino, L., Cortes, S., Dionísio, L., Neto, L., Afonso M.O. e Maia, C. 2013. The first detection of *Leishmania major* in naturally infected *Sergentomyia minuta* in Portugal. Memórias Instituto Oswaldo Cruz 108: 516-18.
- Campino, L., Pratlong, F., Abranches, P., Rioux, J.A., Santos-Gomes, G., Alves-Pires C., Cortes, S., Ramada, J., Cristovão, J.M. e Afonso, M.O., Dedet, J.P. 2006. *Leishmaniasis* in Portugal: enzyme polymorphism of *Leishmania infantum* based on the identification of 213 strains. Tropical Medicine & International Health 11: 1708–1714.
- Cardoso, L., Santos, H., Cordeiro da Silva, A., Pratlong, F., Dedet, J.P. e Rodrigues, M. 2002. *Leishmania infantum* MON-98: infection in a dog from Alto Douro, Portugal. Acta Tropica 83: 83–5.
- Carreira, J.C., Silva, A.V. e Pita Pereira, D., Brazil, R.P. 2012. Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. Parasites & vectors 5: 111.
- Ciaramella, P. e Corona, M. 2003. Canine *Leishmaniasis*: therapeutic aspects. Compendium on continuing education for the practising veterinarian 25: 370-75.
- Cortes, S.J. 2008. Diversidade genética da população parasitária de *Leishmania* em Portugal. Tese de doutoramento. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa: 59-60.
- Cortes, S., Vaz, Y., Neves, R., Maia, C., Cardoso, L. e Campino, L. 2012. Risk factors for canine *Leishmaniasis* in an endemic Mediterranean region. Veterinary parasitology 189: 189-96.
- Cortes, S. Mauricio, I., Almeida, A., Cristovão, J.M., Pratlong, F., Dedet, J.P. e Campino, L. 2006. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. Parasitology international 55: 277-83.
- Crende-Casanegra, F.J., Jul Bauza, S., Llul Grimalt, J.M. e Lladonet, M. 1992. Alternativa al tratamiento clásico de la leishmaniosis mediante el uso de terapia oral. Premios Fundación Purina 1992: 55-68.
- Dipineto, L., Manna, L., Baiano, A., Gala, M., Fioretti, A., Gravino, A.E., Menna, L.F. 2007. Presence of *Leishmania infantum* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in southern Italy. Journal of wildlife diseases 43, 518-20.

- Direcção-Geral da Saúde 2010. Doenças de declaração obrigatória 2004-2008. Versão 12 nov 2013. http://www.portaldasaude.pt/NR/rdonlyres/1FE557EF-97D1-4C6F-9C40-36529B45538C/0/DoencasDeclaracaoObrigatoria_DGS.pdf em Portal da Saúde, <http://www.portaldasaude.pt/>.
- Dougall, A., Shilton, C., Low Chov, J., Alexander, B. e Walton, S. 2009. New reports of Australian cutaneous *Leishmaniasis* in Northern Australian macropods. *Epidemiology and infection* 137: 1516-20.
- Dweik, A., Schönian, G., Mosleh, I.M. e Karanis, P. 2007. Evaluation of PCR-RFLP (based on ITS-1 and *HaeIII*) for the detection of *Leishmania* species, using Greek canine isolates and Jordanian clinical material. *Annals of tropical medicine and parasitology* 101: 399-407.
- El Tail, N.O., Osman, O.F., Fari, M., Presber, W. e Schönian, G. 2000. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 94, 575-9.
- Elnaiem, D.A., Hassan, M.M., Maingon, R., Nureldin, G.H., Mekawi, A.M., Miles, M. e Ward, R.D. 2001. The Egyptian mongoose, *Herpestes ichneumon*, is a possible reservoir host of visceral *Leishmaniasis* in eastern Sudan. *Parasitology* 122, 531-6.
- Evans, K.J. e Kedzierski, L. 2011. Development of Vaccines against Visceral *Leishmaniasis*. *Journal of Tropical Medicine* 2012: 1-14.
- Farca, A.M., Miniscalco, B., Badino, P., Odore, R., Monticelli, P., Trisciuglio, A. e Ferroglio, E. 2012. Canine leishmaniosis: in vitro efficacy of miltefosine and marbofloxacin alone or in combination with allopurinol against clinical strains of *Leishmania infantum*. *Parasitology research* 110: 2509-13.
- Ferreira, E.C., Gontijo, C.M., Cruz, I., Melo, M.N. e Silva, A.M. 2010. Alternative PCR protocol using a single primer set for assessing DNA quality in several tissues from a large variety of mammalian species living in areas endemic for *Leishmaniasis*. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 105: 895-8.
- Ferroglio, E., Poggi, M. e Trisciuglio, A. 2008. Evaluation of 65% permethrin spot-on and deltamethrin-impregnated collars for canine *Leishmania infantum* infection prevention. *Zoonoses and Public Health* 55: 145-8.
- Freitas, J. e Pinheiro, D. 2010. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp. *Revista portuguesa de ciências veterinárias* 109, 11-20.
- Gómez-Ochoa, P., Castillo, J.A., Gascón, M., Zarate, J.J., Alvarez, F. e Couto, C.G. 2009. Use of domperidone in the treatment of canine visceral *Leishmaniasis*: a clinical trial. *The Veterinary Journal* 179: 259–63.
- Harhay, M.O., Oliaro, P.L., Costa, D.L. e Costa, C.H. 2011. Urban parasitology: visceral *Leishmaniasis* in Brazil. *Trends in parasitology* 27: 403-409.
- Helhazar, M., Leitão, J., Duarte, A., Tavares, L. e da Fonseca, I.P. 2013. Natural infection of synanthropic rodent species *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* by *Leishmania infantum* in Sesimbra and Sintra – Portugal. *Parasites & Vectors* 6: 1-6.

- Humberg, R.M., Oshiro, E.T., Cruz, M.S., Ribolla, P.E., Alonso, D.P., Ferreira, A.M., Bonamigo, R.A., Tasso, N.J. e Oliveira, A.G. 2012. *Leishmania chagasi* in opossums (*Didelphis albiventris*) in an Urban Area Endemic for Visceral *Leishmaniasis*, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. The american journal of tropical medicine and hygiene 87: 470-2.
- Isnard, A., Shio, M.T. e Olivier, M. 2002. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. Frontiers in cellular and infection microbiology 2: 72
- Jochim, R.C. e Teixeira, C. 2009. *Leishmania* commandeers the host inflammatory response through neutrophils. Trends in Parasitology 25: 145–7.
- Kazemi, B. 2011. Genomic Organization of *Leishmania* Species. Iran J Parasitol 6: 1–18.
- Kimutai, A., Ngure, P.K., Tonui, W.K., Gicheru, M.M. e Nyamwamu, L.B. 2009. *Leishmaniasis* in northern and western África: a review. Afr. J. Infect. Diseases 3: 14-25.
- Leite, R.S., Ferreira, S.A., Ituassu, L.T., Melo, M.N. e Andrade, A.S. 2010. PCR diagnosis of visceral *Leishmaniasis* in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. Veterinary Parasitology 170: 201–206.
- Lima, H., Rodríguez, N., Barrios, M.A., Avila, A., Cañizales, I. e Gutiérrez, S. 2008. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 103, 412-4.
- Lombardo, G., Pennisi, M.G., Lupo, T., Migliazzo, A., Capri, A. e Solano-Gallego, L. 2012. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. Veterinary Patology 184: 10-7.
- Lopes da Silva, M. A., Medeiros, R. A., Brandão-Filho, S., Lopes de Melo, F. e Medeiros, Z. 2010. Alvos moleculares utilizados em PCR para o diagnóstico da leishmaniose. Revista eletrônica de farmácia 7: 1-15
- Loureiro, F., Pedroso, N., Santos, M.J. e Rosalino, L.M. 2013. Um olhar sobre os carnívoros portugueses. Carnívora. Lisboa
- Luppi, M.M., Malta, M.C., Silva, T.M., Silva, T.M., Silva, F.L., Motta, R.O., Miranda, I., Ecco, R. e Santos, R.L. 2008. Visceral *Leishmaniasis* in captive wild canids in Brazil. Veterinary parasitology 155, 146-51.
- Maia, C., Nunes, M. e Campino, L. 2008. Importance of cats in zoonotic *Leishmaniasis* in Portugal. Vector borne zoonotic diseases 8: 555-9.
- Manzillo, V.F., Piantedosi, D. e Cortese, L. 2005. Detection of *Leishmania infantum* in canine peripheral blood. Veterinary Record 156: 151-152.
- Maroli, M., Pennisi, M.G., Di Muccio, T., Khoury, C., Gradoni, L. e Gramiccia, M. 2007. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. Veterinary Parasitology 145: 357-60.
- Martin Sanchez J., Lopez Lopez, M.C., Acedo Sanchez, C., Castro Fajardo, J.J., Pineda, J.A. e Morillas Marquez, F. 2001. Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. Parasitology 122: 607-15.
- Martínez, V., Quilez, J., Sanchez, A., Roura, X., Francino, O. e Altet, L. 2011. Canine *Leishmaniasis*: the key points for qPCR result interpretation. Parasites & Vectors 4: 1-5.

- Millán, J., Zanet, S., Gomis, M., Trisciuglio, A., Negre, N., Ferroglio, E. 2011. An investigation into alternative reservoirs of canine *Leishmaniasis* on the endemic island of Mallorca (Spain). *Transbound and Emerging Diseases* 58: 352-7.
- Miranda, S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L., Ramis, A. 2008. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Research in Veterinary Science* 85: 35-38
- Miró, G., Gálvez, R., Mateo, M., Montoya, A., Descalzo, M.A. e Molina, R. 2007. Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Veterinary Parasitology* 143: 375-9.
- Miró G., Checa, R., Montoya, A., Hernández, L., Dado, D. e Gálvez, R. 2012. Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. *Parasites & Vectors* 5: 1-7.
- Molina, R., Jimenez, M.I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S. e Bernal, J. 2012. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Veterinary Parasitology* 190: 268-71.
- Moreno, J., Vouldoukis, I., Martín, V., McGahie, D., Cuisinier, A.M. e Gueguen, S. 2012. Use of a LiESP/QA-21 Vaccine (CaniLeish) Stimulates an Appropriate Th1-Dominated Cell-Mediated Immune Response in Dogs. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 6: 1-7.
- Mottram, J.C., Brooks, D.R. e Coombs, G.H. 1998. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Current opinion in microbiology* 1, 455–60.
- Nejjar, R., Lemrani, M., Boucedda, L., Amarouch, H. e Benslimane, A. 2000. Variation in antibody titres against *Leishmania infantum* in naturally infected dogs in northern Morocco. *Revue Méd. Vét* 151: 841-846.
- Neto, J.C., Werneck, G.L. e Costa, C.H.N. 2009. Fatores associados à incidência da leishmaniose visceral em área urbana: um estudo ecológico em Teresina, Piauí, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública* 25: 1543-1551.
- Nolder, D., Roncal, N., Davies, C.R., Llanos-Cuentas, A. e Miles, M.A. 2007. Multiple hybrid genotypes of *Leishmania* (viannia) in a focus of mucocutaneous *Leishmaniasis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 76: 573-8.
- Palatnik-de-Sousa, C.B. 2012. Vaccines for Canine *Leishmaniasis*. *Frontiers in immunology* 3: 69.
- Pennisi, M.G., De Majo, M., Masucci, M., Britti, D., Vitale, F. e Del Maso, R. 2005. Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniosis with a combination of metronidazole and spiramycin. *Veterinary Record* 156: 346-9.
- Pereira da Fonseca, I.M., Cortes, S., Magalhães, A., Madeira de Carvalho, L.M., Meireles, J.A.F.S., Santos Gomes, G.M., Campino, L. e Fazendeiro, M.I. 2002. Prevalência de *Leishmania* spp. em raposas vermelhas (*Vulpes vulpes silacea*, Miller, 1907) em Portugal. Comunicação oral. 2º Encontro da Sociedade Portuguesa de Epidemiologia e Medicina Veterinária Preventiva, Montemor-o-Novo, Hospital Infantil S. João de Deus.
- Pozio, E., Maroli, M., Gradoni, L. e Gramiccia, M. 1985. Laboratory transmission of *Leishmania infantum* to *Rattus rattus* by the bite of experimentally infected *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene* 79, 524-6.

- Ready, PD. 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill* 15
- Rebêlo, M.E.C. 1988. Contribuição para o estudo do diagnóstico da Leishmaniose Canina. *Laboratório Nacional de Investigação Veterinária* 17: 195.
- Reithinger, R., Djardin, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B. e Brooker, S. 2007. Cutaneous *Leishmaniasis*. *The Lancet infectious diseases* 7: 581-96.
- Riera, C. e Valladares, J.E. 1996. Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. *Parasitology Today* 12: 412.
- Rolão, N., Martins, M.J., João, A. e Campino, L. 2005. Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite* 12: 183-6.
- Rosa, G.M., Duarte, A., Marques, C., Santos, N., Fonseca, I. e Tavares, L. 2013. Poster. International SCIVAC Congress • PISA, March 8th-10th 2013 canine *Leishmaniasis* and other vector-borne diseases: current state of knowledge.
- Rose, K., Curtis, J., Baldwin, T., Mathis, A., Kumar, B., Sakthianandeswaren, A., Spurck, T., Low Chov, J. e Handman, E. 2004. Cutaneous *Leishmaniasis* in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms. *International journal for parasitology* 34: 655–64.
- Ruiz-Fons, F., Ferroglio, E. e Gortazar, C. 2013. *Leishmania infantum* in free-ranging hares, Spain, 2004-2010. *Euro surveillance* 18. 1-5.
- Sacks, D., Sher, A. 2002. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. *Nature immunology* 3: 1041-7.
- Sastre, N., Francino, O., Ramírez, O., Enseñat, C., Sánchez A. e Altet, L. 2008. Detection of *Leishmania infantum* in captive wolves from Southwestern Europe. *Veterinary parasitology* 158: 117-20.
- Semião Santos, S.J., Abranches, P., Silva Pereira, M.C., Santos Gomes, G.M., Fernandes, J.P. e Vetter, J.C. 1996. Reliability of serological methods for detection of *Leishmaniasis* in portuguese domestic and wild reservoirs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91: 747-50.
- Sharma, U., Singh, S. 2008. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *Journal of Vector Borne Diseases* 45: 255–272.
- Singh, N., Mishra, J., Singh, R. e Singh, S. 2012. Animal reservoirs of visceral *Leishmaniasis* in India. *The journal of parasitology* 99: 64-7
- Sobrinho, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millan, J., Revilla, M., Arnal, M.C., Trisciuglio, A. e Gortázar, C. 2008. Characterization of widespread canine *Leishmaniasis* among wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology* 155: 198–203.
- Solano-Gallego, L., Llull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J. e Ferrer, L. 2000. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Veterinary parasitology* 90: 37-45.
- Solano-Gallego, L., Rossi, L., Scroccaro, A.M., Montarsi, F., Caldin, M., Furlanello, T. e Trotta, M. 2012. Detection of *Leishmania infantum* DNA mainly in *Rhipicephalus sanguineus* male ticks removed from dogs living in endemic areas of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors* 5: 98.

- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. e Baneth, G. 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors* 4: 86.
- Spickler, A., Roth, J., Galyon, J., Lofstedt, J. 2010. Emerging and exotic diseases of animals. The Center for Food Security e Public Health, 4^a ed., pp 205-210, Iowa State University, USA
- Srivastava, A., Sweat, J.M., Azizan, A., Vesely, B. e Kyle, D.E. 2013. Real-Time PCR to quantify *Leishmania donovani* in hamsters. *Journal of Parasitology* 99: 145-150.
- World Organisation for Animal Health 2008. Leishmaniosis. OIE Terrestrial Manual 2008: 240-250.

